



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ivana G. Zlatanović

Hemijski sastav, antibakterijska, antioksidativna i genotoksična aktivnost lišajeva *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise, *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. i *Evernia prunastri* (L.) Ach.

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2019



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS



Ivana G. Zlatanović

Chemical composition, antibacterial, antioxidant and genotoxic activity of lichens *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise, *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. and *Evernia prunastri* (L.) Ach.

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Гордана Стојановић, редовни професор Природно-математичког факултета, Универзитета у Нишу

Наслов:

Хемијски састав, антибактеријска, антиоксидативна и генотоксична активност лишајева *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise, *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Nav. и *Evernia prunastri* (L.) Ach

Резиме:

У оквиру ове докторске дисертације испитиван је хемијски састав ацетонских, етарских, етил-ацетатних и дихлорметанских екстраката као и антиоксидативна, антибактеријска и генотоксична активност ацетонских екстраката лишајева *Umbilicaria crustulosa*, *Umbilicaria cylindrica*, *Hypogymnia tubulosa* и *Evernia prunastri*. Одређиван је садржај појединих елемената. Садржај радионуклида одређен је за врсту *E. prunastri*. Испитивана је и антихолинестеразна активност ацетонских екстраката и изоловане гирофорне киселине. Најзаступљенија компонента ацетонских екстраката лишаја *U. crustulosa* и *U. cylindrica* је гирофорна киселина. Главне компоненте ацетонског, етарског и етил-ацетатног екстракта лишаја *H. tubulosa* су физодична киселина и 3-хидроксифизиодична киселина. Најзаступљенија компонента ацетонског екстракта лишаја *E. prunastri* је евернична киселина. Састав дихлорметанских екстраката свих испитиваних лишајева је различит од осталих екстраката при чему је доминантна компонента атранорин а депсиди и депсидони су заступљени у мањем проценту. Орцинол, атрарична и орселинска киселина су најзаступљеније испарљиве лишајевске супстанце у екстрактима *U. crustulosa*, *U. cylindrica* и *E. prunastri* док су у екстрактима *H. tubulosa* најзаступљеније оливетол, 3-хидроксиоливетонид и оливетонид. Лишај *U. cylindrica* има највећи садржај микроелемената Al, Co, Cr, Fe, Mn, V, Ba, Cd и Pb док је садржај B, Si и Zn највећи у лишају *U. crustulosa* а Ni у *H. tubulosa*. Специфична активност ^{40}K је износила 108 Bq kg^{-1} док су активности ^{137}Cs , ^{226}Ra и ^{232}Th биле испод граница детекције. Резултати антиоксидативне активности указују на већи антиоксидативни капацитет депсидона у односу на депсиде.

Грам-негативне бактерије су резистентне на испитиване екстракте. Екстракти *U. cylindrica*, *E. prunastri* и *H. tubulosa* показују умерену бактерицидну активност на Грам-позитивне бактерије. Највеће смањење учесталости микронуклеуса у ћелијама хуманих лимфоцита показују екстракти у концентрацији од 2 mg mL⁻¹. Екстракти *H. tubulosa*, *E. prunastri* и гирофорне киселине у концентрацији од 10 mg mL⁻¹ показују инхибирајући ефекат на активност холинестеразе.

Научна област:

Хемија

Научна
дисциплина:

Органска хемија и биохемија

Кључне речи:

Umbilicaria crustulosa, *Umbilicaria cylindrica*, *Hypogymnia tubulosa*, *Evernia prunastri*, HPLC, GC-MS, радионуклиди, антиоксидативна активност, антибактеријска активност, микронуклеусни тест

УДК:

581.192 : 582.29
615.3 : 582.29
615.099 : 582.29

CERIF
класификација:

P 003 и P 390 Хемија и Органска хемија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Gordana Stojanović Ph.D., Full professor, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš

Title:

Chemical composition, antibacterial, antioxidant and genotoxic activity of lichens *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise, *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. and *Evernia prunastri* (L.) Ach.

Abstract:

Through this doctoral thesis chemical composition of acetone, ether, ethyl acetate and dichloromethane extracts and antioxidant, antibacterial and genotoxic activity of acetone extracts of the lichens *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise, *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. and *Evernia prunastri* (L.) Ach. were examined. Study on the content of the certain elements in these lichens was also carried out. Activity concentration of ^{40}K , ^{137}Cs , ^{226}Ra and ^{232}Th was determined only for lichen *E. prunastri*. Anticholinesterase activity of acetone extracts and isolated gyrophoric acid was also examined. The most abundant component of acetone extracts of lichen *U. crustulosa* and *U. cylindrica* was gyrophoric acid. The main components of acetone, ether and ethyl acetate extracts of *H. tubulosa* were physodic acid and the 3-hydroxyphysodic acid. The most abundant component of acetone extract of *E. prunastri* was evernic acid. The composition of dichloromethane extracts of all investigated lichens was different from the other extracts, atranorine was dominant component followed with small quantities of depsides and depsidons. Orcinol, atraric acid and orsellinic acid were the major volatile compounds in *U. crustulosa*, *U. cylindrica* and *E. prunastri* extracts, while olivetol, 3-hydroxyolivetonide and olivetonide were the main volatiles in *H. tubulosa* extracts. *Umbilicaria cylindrica* has the highest content of Al, Co, Cr, Fe, Mn, V, Ba, Cd and Pb while the content of B, Si and Zn is the largest in *U. crustulosa* sample. The activity of ^{40}K was 108 Bq kg^{-1} while the activities of ^{137}Cs , ^{226}Ra and ^{232}Th were below minimal detectable activities. The results of antioxidant activity indicated a higher antioxidant capacity of depsidone compared to the depside. Gram-negative bacteria were resistant to the tested extracts. Extracts of *U. cylindrica*, *E. prunastri*

and *H. tubulosa* had inhibition effect towards Gram-positive bacteria. The highest decreasing in the micronucleus frequency were indicated by extracts at concentration of 2 mg mL⁻¹. Extracts of *H. tubulosa*, *E. prunastri* and gyrophoric acid at concentration of 10 mg mL⁻¹ showed an inhibitory effect on cholinesterase activity.

Scientific
Field:

Chemistry

Scientific
Discipline:

Organic Chemistry and Biochemistry

Key Words:

Umbilicaria crustulosa, *Umbilicaria cylindrica*, *Hypogymnia tubulosa*, *Evernia prunastri*, HPLC, GC-MS, antioxidant activity, antibacterial activity, micronucleus test, anticholinesterase activity

UDC:


581.192 : 582.29
615.3 : 582.29
615.099 : 582.29

CERIF
Classification:

P 003 i P 390, Chemistry and Organic Chemistry

Creative
Commons
License Type:

CC BY-NC-ND

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Ивана Г. Златановић
Ментор, МН:	Гордана Стојановић
Наслов рада, НР:	Хемијски састав, антибактеријска, антиоксидативна и генотоксична активност лишајева <i>Umbilicaria crustulosa</i> (Ach.) Frey, <i>Umbilicaria cylindrica</i> (L.) Delise, <i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaer.) Nav. и <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2019.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/списка/тафика/прилога)	5 поглавља, 125 страна, 87 цитата, 18 табела, 32 слике, 58 прилога
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	<i>Umbilicaria crustulosa</i> , <i>Umbilicaria cylindrica</i> , <i>Hypogymnia tubulosa</i> , <i>Evernia prunastri</i> , HPLC, GC-MS, радионуклиди, антиоксидативна активност, антибактеријска активност, микронуклеусни тест
УДК	581.192 : 582.29 615.3 : 582.29 615.099 : 582.29
Чува се, ЧУ:	библиотека

Важна напомена, ВН:	Израда докторске дисертације је финансирана од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројекта „Природни производи биљака и лишајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена” (евиденциони број пројекта 172047)						
Извод, ИЗ:	<p>У оквиру ове докторске дисертације испитиван је хемијски састав ацетонских, етарских, етил-ацетатних и дихлорметанских екстраката као и антиоксидативна, антибактеријска и генотоксична активност ацетонских екстраката лишајева <i>Umbilicaria crustulosa</i>, <i>Umbilicaria cylindrica</i>, <i>Hypogymnia tubulosa</i> и <i>Evernia prunastri</i>. Одређиван је садржај појединих елемената. Садржај радионуклида одређен је за врсту <i>E. prunastri</i>. Испитивана је и антихолинестеразна активност ацетонских екстраката и изоловане гирофорне киселине. Најзаступљенија компонента ацетонских екстраката лишаја <i>U. crustulosa</i> и <i>U. cylindrica</i> је гирофорна киселина. Главне компоненте ацетонског, етарског и етил-ацетатног екстракта лишаја <i>H. tubulosa</i> су физодична киселина и 3-хидрокси физодична киселина. Најзаступљенија компонента ацетонског екстракта лишаја <i>E. prunastri</i> је евернична киселина. Састав дихлорметанских екстраката свих испитиваних лишајева је различит од осталих екстраката при чему је доминантна компонента атранорин а депсиди и депсидони су заступљени у мањем проценту. Орцинол, атрарична и орселинска киселина су најзаступљеније испарљиве лишајевске супстанце у екстрактима <i>U. crustulosa</i>, <i>U. cylindrica</i> и <i>E. prunastri</i> док су у екстрактима <i>H. tubulosa</i> најзаступљеније оливетол, 3-хидрокси оливетонид и оливетонид. Лишај <i>U. cylindrica</i> има највећи садржај микроелемената Al, Co, Cr, Fe, Mn, V, Ba, Cd и Pb док је садржај B, Si и Zn највећи у лишају <i>U. crustulosa</i> а Ni у <i>H. tubulosa</i>. Специфична активност ^{40}K је износила 108 Bq kg^{-1} док су активности ^{137}Cs, ^{226}Ra и ^{232}Th биле испод граница детекције. Резултати антиоксидативне активности указују на већи антиоксидативни капацитет депсидона у односу на депсиде. Грам-негативне бактерије су резистентне на испитиване екстракте. Екстракти <i>U. cylindrica</i>, <i>E. prunastri</i> и <i>H. tubulosa</i> показују умерену бактерицидну активност на Грам-позитивне бактерије. Највеће смањење учесталости микронуклеуса у ћелијама хуманих лимфоцита показују екстракти у концентрацији од 2 mg mL^{-1}. Екстракти <i>H. tubulosa</i>, <i>E. prunastri</i> и гирофорне киселине у концентрацији од 10 mg mL^{-1} показују инхибирајући ефекат на активност холинестеразе.</p>						
Датум прихватања теме, ДП:	03.04.2017.						
Датум одбране, ДО:							
Чланови комисије, КО:	<table border="0"> <tr> <td data-bbox="483 1675 671 1715">Председник:</td> <td data-bbox="679 1675 1508 1904" rowspan="5" style="vertical-align: middle; text-align: center;">}</td> </tr> <tr> <td data-bbox="483 1720 671 1760">Члан:</td> </tr> <tr> <td data-bbox="483 1765 671 1805">Члан:</td> </tr> <tr> <td data-bbox="483 1809 671 1850">Члан:</td> </tr> <tr> <td data-bbox="483 1854 671 1904">Члан, ментор:</td> </tr> </table>	Председник:	}	Члан:	Члан:	Члан:	Члан, ментор:
Председник:	}						
Члан:							
Члан:							
Члан:							
Члан, ментор:							



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Ivana G. Zlatanović
Mentor, MN :	Gordana Stojanović
Title, TI :	Chemical composition, antibacterial, antioxidant and genotoxic activity of lichens <i>Umbilicaria crustulosa</i> (Ach.) Frey, <i>Umbilicaria cylindrica</i> (L.) Delise, <i>Hypogymnia tubulosa</i> (Schaer.) Hav. and <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach.
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2019.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/ appendixes)	5 chapters, 125 pages, 87 references, 18 tables, 32 figures, 58 appendixes
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	Organic chemistry and Biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	<i>Umbilicaria crustulosa</i> , <i>Umbilicaria cylindrica</i> , <i>Hypogymnia tubulosa</i> , <i>Evernia prunastri</i> , HPLC, GC-MS, radionuclides, antioxidant activity, antibacterial activity, micronucleus test, anticholinesterase activity
UC	581.192 : 582.29 615.3 : 582.29 615.099 : 582.29
Holding data, HD :	library

Note, N :	PhD Research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the project „Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application” (No. 172047)
Abstract, AB :	<p>Through this doctoral thesis chemical composition of acetone, ether, ethyl acetate and dichloromethane extracts and antioxidant, antibacterial and genotoxic activity of acetone extracts of the lichens <i>Umbilicaria crustulosa</i> (Ach.) Frey, <i>Umbilicaria cylindrica</i> (L.) Delise, <i>Hypogimnia tubulosa</i> (Schaer.) Hav. and <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach. were examined. Study on the content of the certain elements in these lichens was also carried out. Activity concentration of ^{40}K, ^{137}Cs, ^{226}Ra and ^{232}Th was determined only for lichen <i>E. prunastri</i>. Anticholinesterase activity of acetone extracts and isolated gyrophoric acid was also examined. The most abundant component of acetone extracts of lichen <i>U. crustulosa</i> and <i>U. cylindrica</i> was gyrophoric acid. The main components of acetone, ether and ethyl acetate extracts of <i>H. tubulosa</i> were physodic acid and the 3-hydroxyphysodic acid. The most abundant component of acetone extract of <i>E. prunastri</i> was evernic acid. The composition of dichloromethane extracts of all investigated lichens was different from the other extracts, atranorine was dominant component followed with small quantities of depsides and depsidons. Orcinol, atraric acid and orsellinic acid were the major volatile compounds in <i>U. crustulosa</i>, <i>U. cylindrica</i> and <i>E. prunastri</i> extracts, while olivetol, 3-hydroxyolivetonide and olivetonide were the main volatiles in <i>H. tubulose</i> extracts. <i>Umbilicaria cylindrica</i> has the highest content of Al, Co, Cr, Fe, Mn, V, Ba, Cd and Pb while the content of B, Si and Zn is the largest in <i>U. crustulosa</i> sample. The activity of ^{40}K was 108 Bq kg^{-1} while the activities of ^{137}Cs, ^{226}Ra and ^{232}Th were below minimal detectable activities. The results of antioxidant activity indicated a higher antioxidant capacity of depsidone compared to the depside. Gram-negative bacteria were resistant to the tested extracts. Extracts of <i>U. cylindrica</i>, <i>E. prunastri</i> and <i>H. tubulosa</i> had inhibition effect towards Gram-positive bacteria. The highest decreasing in the micronucleus frequency were indicated by extracts at concentration of 2 mg mL^{-1}. Extracts of <i>H. tubulosa</i>, <i>E. prunastri</i> and gyrophoric acid at concentration of 10 mg mL^{-1} showed an inhibitory effect on cholinesterase activity.</p>
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	03.04.2017.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member:
	Member
	Member, Mentor:

Skraćenice

- AMDIS - *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*
(automatizovani sistem za identifikaciju i dekonvoluciju masenih spektara)
- ABTS - 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
- APCI- *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*- hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BuTC- Butiriltioholin
- BHT- Butilovani hidroksitoluen
- ¹³C NMR- nuklearna-magnetna rezonantna spektroskopija ugljenika ¹³C
- CDCl₃- deuterisani hloroform
- CID- *Charge Injection Device*
- CI - *Chemical Ionisation* (hemijska jonizacija)
- CUPRIC - *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*
- DMSO-d₆- deuterisani dimetilsulfoksid
- DTNB-5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat)
- DPPH-2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
- DNK-dezoksiribonukleinska kiselina
- DEPT- *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
d-dublet
- EI-*Electron Ionisation* (jonizacija elektronima)
- ESI- *Electrosprey Ionisation* (jonizacija elektrosprejom)
- FID-*Flame Ionisation Detector* (plameno jonizacioni detektor)
- FAB-*Fast Atom Bombardment* (bombardovanje brzim atomima)
- GC-*Gas Chromatography*, Gasna hromatografija
- GSC-*Gas Solid Chromatography* (hromatografija gas-čvrsto)
- GLC- *Gas Liquid Chromatography* (hromatografija gas-tečno)
- GC-MS- *Gas Chromatography-Mass spectrometry* (Gasna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom)
- HPLC- *High Pressure Liquid Chromatography* (Tečna hromatografija pod visokim pritiskom)
- ¹H NMR-protonska nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija

$^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY- $^1\text{H} - ^1\text{H}$ *Correlation Spectroscopy* (Homonuklearna $^1\text{H} - ^1\text{H}$ korelisana dvodimenzionalna nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)

HMBC- *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC- *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IC50- *Half Maximal Inhibitory Concentration*

ICP-*Inductively Coupled Plasma*-(induktivno spregnuta plazma)

ICP-OES- *Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometer* (Optičko emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom)

LC- *Liquid Chromatography*, Tečna hromatografija

LLC- *Liquid Liquid Chromatography* (hromatografija tečno-tečno)

LSC- *Liquid Solid Chromatography* (hromatografija tečno-čvrsto)

LOD-*Limit of Detection* (granica detekcije)

MS-*Mass Spectrometer* (maseni detektor)

MALDI- *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation* (laserska desorpcija sa matriksa)

MMC -mitomicin C

NMR- *Nuclear Magnetic Resonance* (nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija)

NCCLS-*National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Američki Nacionalni komitet za kliničko laboratorijske standarde)

m/z- *Mass to Charge Ratio* (odnos mase i naelektrisanja jona)

RI -*Retention Index* (eksperimentalni retencioni indeksi)

RL - literaturni retencioni indeksi

SD- standardna devijacija

s-singlet

SCAN- snimanje kompletnog masenog spektra

SIM -*Selected Ion Monitoring*

SFC- *Supercritical Fluid Chromatography*-hromatografija superkritičnim fluidima

TMS-tetrametilsilan

TIC-*Total Ion Current* (ukupni jonski hromatogram)

TPC-*Total Phenolic Content* (ukupni sadržaj fenola)

TRP-*Total Reducing Power* (ukupna redukciona moć)

TCD- detektori termalne provodljivosti

UV-*Ultraviolet* (ultraljubičasti deo spektra)

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena”, (evidencioni broj OI 172047, rukovodilac projekta profesor Gordana Stojanović). Eksperimenti na osnovu kojih je određen hemijski sastav, antioksidativna i antibakterijska aktivnost, kao i sadržaj makro i mikroelemenata su rađeni u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Veliku zahvalnost dugujem svojim dragim profesorima Olgi Jovanović, Snežani Tošić, Aleksandri Đorđević, Goranu Petroviću, Violeti Mitić i Niku Raduloviću na ukazanoj pomoći tokom izrade disertacije.

Moje drage kolegenice Ivana Dimitrijević (devojačko prezime Zrnzević), Marija Dimitrijević i Jelena Nikolić (devojačko prezime Cvetković) su pomogle u izvođenju eksperimenata. Veliko hvala!

Eksperiment antiholinesterazne aktivnosti je rađen u Opštoj bolnici u Pirotu na čemu sam zahvalna profesorici Vesni Stankov Jovanović.

Ispitivanje uticaja na učestalost mikronukleusa i ispitivanje sadržaja radionuklida sprovedeno je u laboratorijama Javnog preduzeća “Nuklearni objekti Srbije” . Veliko hvala dr Miroslavi Stanković i dr Nataši Lazarević na eksperimentalnim podacima i pomoći prilikom diskusije rezultata ispitivanja.

U sakupljanju lišajevskog materijala učestvovali su profesor Gordana Stojanović, mentor, i profesor Bojan Zlatković sa Departmana za Biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, koji je i identifikovao sakupljeni material. Hvala!

Neizmerno sam zahvalna svom mentoru, prof. dr Gordani Stojanović na svemu što sam naučila od nje tokom izrade doktorske disertacije, kao i prilici da budem deo njenog istraživačkog tima.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj kolegenici i kumi Ivani Dimitrijević na podršci i pomoći tokom svih godina studija.

Od srca se zahvaljujem mojim roditeljima i bratu koji su verovali u mene i podržavali me u svemu. I na kraju, nemerljivu zahvalnost dugujem svom suprugu Janku Đajiću za bezrezervnu podršku.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKE OSNOVE	3
2.1. FILOGENETSKO STABLO I MORFOLOGIJA LIŠAJEVA	3
2.2. LIŠAJEVSKJE SUPSTANCE, BIOSINTEZA I STRUKTURA	8
2.3. INSTRUMENTALNE METODE ANALIZE: HPLC, GC-MS, ICP-OES	16
2.3.1. TEČNA HROMATOGRAFIJA POD VISOKIM PRITISKOM, HPLC	16
2.3.2. GASNA HROMATOGRAFIJA SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM, GC-MS	19
2.3.3. OPTIČKA EMISIONA SPEKTROMETRIJA SA INDUKTIVNO SPREGNUTOM PLAZMOM, ICP-OES	22
2.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	23
2.4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA LIŠAJEVA I NJIHOVIH SEKUNDARNIH METABOLITA	23
2.4.2. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	24
2.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA ISPITIVANIH LIŠAJEVA I NJIHOVIH SEKUNDARNIH METABOLITA	25
2.6. GENOTOKSIČNA AKTIVNOST EKSTRAKATA LIŠAJEVA I NJIHOVIH SEKUNDARNIH METABOLITA	26
2.7. UTICAJ NA AKTIVNOST HOLINESTERAZE	27
2.8. OSTALE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI LIŠAJEVA	28
3. EKSPERIMENTALNI DEO	30
3.1. APARATI	30
3.2. REAGENSI I RASTVORI	30
3.3. LIŠAJEVSKI MATERIJAL	32
3.4. PRIPREMA EKSTRAKATA	32
3.5. HPLC ANALIZA	33
3.6. GC-MS ANALIZA	33
3.7. NMR ANALIZA	34
3.8. ODREĐIVANJE SPECIFIČNE AKTIVNOSTI ^{40}K , ^{137}Cs , ^{226}Ra I ^{232}Th	34
3.9. ICP-OES ANALIZA	35
3.10. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	36
3.11. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ACETONSKIH EKSTRAKATA	38
3.12. ISPITIVANJE UTICAJA ACETONSKIH EKSTRAKATA NA FORMIRANJE MIKRONUKLEUSA U LIMFOCITIMA HUMANE KRVNE PLAZME	39
3.13. ISPITIVANJE UTICAJA ACETONSKIH EKSTRAKATA NA AKTIVNOST SERUMSKE HOLINESTERAZE	40
4. REZULTATI I DISKUSIJA	41
4.1. HEMIJSKI SASTAV	41
4.1.1. HPLC ANALIZA ACETONSKIH, ETARSKIH, ETIL-ACETATNIH I DIHLORMETANSKIH EKSTRAKATA	41
4.1.2. GC-MS ANALIZA ETARSKIH, ETIL-ACETATNIH I DIHLORMETANSKIH EKSTRAKATA	50
4.1.3. NMR ANALIZA	60
4.1.4. SPECIFIČNA AKTIVNOST RADIONUKLIDA ^{40}K , ^{137}Cs , ^{226}Ra I ^{232}Th U LIŠAJU <i>E. PRUNASTRI</i>	63

4.1.5 ICP-OES ANALIZA	65
4.2.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	68
4.2.2. ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	72
4.2.3. MIKRONUKLEUSNI TEST	74
4.2.4. UTICAJ ACETONSKIH EKSTRAKATA I GIROFORNE KISELINE NA AKTIVNOST HOLINESTERAZE	77
<u>5. ZAKLJUČAK</u>	<u>80</u>
<u>6. LITERATURA</u>	<u>84</u>
<u>7. PRILOG</u>	<u>92</u>
<u>8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM</u>	<u>126</u>

U V O D

1. UVOD

Lišajevi (lat. *lichenes*) predstavljaju stabilnu zajednicu koja se formira od alge ili cijanobakterije (fotobionta) i gljive (mikobionta) pri čemu se razvija obostrano koristan odnos (simbioza). Lišajevske gljive su vrlo selektivne i formiraju zajednicu samo sa određenim fotobiontom, algom koja sadrži hlorofil ili cijanobakterijom koja sadrži modrozeleni fotosintetski pigment koji vrši fotosintezu pri čemu proizvodi organska jedinjenja neophodna mikobiontu (Honegger, 1998). S druge strane, gljiva sakuplja vodu i sintetiše sekundarne metabolite čime omogućava zaštitu fotobionta (Huneck, 1999). Lišajevi se smatraju pionirima vegetacije na kopnenim staništima i imaju sposobnost adaptacije na ekstremne uslove života, pa se tako mogu prilagoditi visokoj temperaturi, suši, salinitetu, aerozagađenju (Nash, 2008).

S obzirom da nemaju korenov sistem poput viših biljaka, lišajevi apsorbuju vodu, minerale, ali i teške metale iz atmosfere i akumuliraju ih u talusu, pa su postali značajni bioindikator zagadjenja metalima (Hawksworth i MCManus 1989, Lawrey 1993, Bosch-Roig i saradnici, 2013).

Lišajevi proizvode dve grupe metabolita: primarne (intracelularne) i sekundarne (ekstracelularne). Primarni metaboliti su aminokiseline, proteini, lipidi, ugljeni hidrati i druge organske komponente koje su esencijalne za njihov rast i razvoj. Neke od ovih metabolita proizvode lišajevske gljive ili njihovi partneri alge ili cijanobakterije. Sekundarne metabolite proizvode isključivo gljive lišajeva i izlučuju ih na površinu hifa, a nazivaju se lišajevske supstance ili lišajevske kiseline (Muller, 2001). U hemijskom pogledu lišajevi proizvode različite tipove sekundarnih metabolita (alifatične, aromatične i terpenске konstitute) od kojih većina nije rastvorna u vodi (Huneck i Yoshimura, 1996). Ove supstance su pokazale značajnu antimikrobnu aktivnost i mogu biti korišćene kao izvor antibiotika (Lawrey, 1989). Pored toga, sekundarni metaboliti su važni u taksonomiji lišajeva. Do sada je identifikovano oko 1050 sekundarnih metabolita, pri čemu je zapaženo da imaju različite biološke aktivnosti kao što su: antioksidativna (Hidalgo i saradnici, 1994), antimikrobna (Ranković i saradnici, 2009), antivirusna (Neamati i saradnici, 1997), antitumorska (Kosanić i saradnici, 2012), antiherbivorna (Lawrey, 1986) i UV protektivna (Fernandez i saradnici, 1998). Ove komponente su bitan faktor u homeostazi metala i toleranciji talusa na zagadjenje (Molnar i Farkas, 2010).

U V O D

S obzirom da gotovo sve vrste *Umbilicaria* sadrže giroformnu kiselinu u prošlosti su ih Indijanci koristili kao sredstvo za bojenje. Neke vrste se koriste kao hrana ili predstavljaju deo tradicionalne medicine u Kini (Huneck, 1999). U Japanu se vrsta *U. esculenta*, poznata i kao pečurka stena ili „iwatake”, prodaje kao delikates i koristi u salatama. Generalno, lišajevi roda *Umbilicaria* su korišćeni u ishrani u Severnoj Americi u vanrednim uslovima jer imaju visoku hranljivu vrednost, za trećinu više od iste količine meda ili kukuruznih pahuljica, ali se nažalost ne mogu uvrstiti u redovnu ishranu zbog njihovog sporog rasta.

Širu upotrebu u industriji parfema imaju dve vrste lišajeva, *Pseudevernia furfuracea* poznata kao “tree moss” i *Evernia prunastri* poznata kao “oak moss” ili “mousse de chene”. Komponente koje doprinose “zelenom” mirisu parfema su aromatični estri lišajeva koji obezbeđuju postojanost mirisa na koži (Joulain i Tabacchi, 2008). U kozmetičkoj industriji koristi se i usninska kiselina kao konzervans u kremama (Seifert i Bertram, 1995). Pored toga, mnoge lišajevske supstance apsorbuju UV svetlost i koriste se kao UV protektanti u kremama za sunčanje. Atranorin, giroforna kiselina i usninska kiselina se dodaju u preparatima za sunčanje čime se obezbeđuje zaštita od UV zračenja (Fernandez i saradnici, 1998).

Ekstrakti lišajeva *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey i *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise su pokazali citotoksičnu aktivnost prema ćelijama humanog melanoma i karcinoma kolona (Kosanić i saradnici, 2012). Evernična kiselina izolovana iz lišaja *Evernia prunastri* (L.) Ach. (Kosanić i saradnici, 2012), 3-hidroksifizodična kiselina izolovana iz ekstrakta *Hypogimnia tubulosa* (Schaer.) Hav. (Yılmaz i saradnici, 2005; Kosanić i saradnici, 2013) i giroforna kiselina izolovana iz više vrsta roda *Umbilicaria* (Candan i saradnici, 2006; Buçukoglu i saradnici, 2013) pokazale su jaku antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost, kao i izražen citotoksični efekat. Uzimajući u obzir navedene aktivnosti lišajeva *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *E. prunastri* i *H. tubulosa*, cilj ove doktorske disertacije bio je:

- Dobijanje acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata lišajeva;
- Određivanje hemijskog sastava ekstrakata;
- Izolovanje giroforne kiseline iz ekstrakta *U. crustulosa* i strukturna determinacija;
- Odredjivanje sadržaja odabranih elemenata sušenog lišajevskog materijala;
- Određivanje antioksidativnog kapaciteta acetonskih ekstrakata;
- Ispitivanje antibakterijske aktivnosti acetonskih ekstrakata;
- Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme i
- Određivanje uticaja acetonskih ekstrakata na aktivnost serumske holinesteraze.

2. TEORIJSKE OSNOVE

2.1. Filogenetsko stablo i morfologija lišajeva

Lišajevi nisu taksonomska kategorija već predstavljaju način života, po nekim autorima simbiozu, a po drugima parazitizam, usled čega su svrstani u carstvo Gljiva (Fungi) (Ahmadian, 1993). Oko 98% gljiva koje ulaze u sastav lišajeva pripada porodici Ascomycota, a ostatak je iz porodice Basidomycota i Deuteromycota. Samo 21% gljiva može da bude mikobiont lišajeva. Fotobiont u oko 98% lišajeva nije poznat na nivou vrste. Telo lišaja se naziva talus. Na osnovu veličine i izgleda talusa razlikuju se sledeći morfološki oblici:

- Korasti lišajevi koji su celim talusom vezani za supstrat (kora drveta, stena) pa ih je teško odvojiti. Oko 80% svih lišaja ima ovakav talus najprostije građe;
- Listasti (foliozni) lišajevi koji imaju talus oblika režnjevite lisne ploče, na kojoj se razlikuju gornja i donja strana. Lagano su pričvršćeni za podlogu (najčešće drvo) preko pojedinačnih hifa. Morfološki su složeniji od korastih lišajeva i
- Žbunasti (frutikozni) lišajevi koji su izgrađeni od delova koji liče na žbuniće i imaju žbunasti ili nitasti talus koji je razgranat i visi sa podloge. Obično su u jednoj tački labavo pričvršćeni za supstrat. Morfološki predstavljaju najsloženiji oblik talusa (Nash, 2008).

Postoje i lišajevi koji mogu da imaju razgranat talus u obliku žbunića sa pljosnatim granama za koji se smatra da predstavlja dvojni (mešoviti) tip talusa radijalne građe.

Lišajevi stvaraju tanjirasta plodonosna tela, apotecije, kao i gljive. Lišajevi se mogu razmnožavati polno pomoću spora koje nastaju u apotecijama. Pored polnog razmnožavanja lišajevi se mogu i vegetativno razmnožavati na jedan od tri načina:

- Fragmentacijom talusa (regeneracijom) kada delovi talusa padaju na podlogu i formiraju novi lišaj;
- Pomoću soredija, izraslina okruglastog oblika koje se obrazuju ispod gornje kore. Nakon pucanja kore lišaja soredije se raznose vetrom i
- Pomoću izidija, izraslina koje su krupnije od soredija. Štapićastog su oblika i nastaju na površini talusa, i raznose se vetrom.

Taksonomska klasifikacija ispitivanih lišajeva data je u Tabeli 1.

TEORIJSKE OSNOVE

Tabela 1. Taksonomija lišajeva *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *H. tubulosa* i *E. prunastri*

Taksonomske kategorije	Taksoni	Taksoni	Taksoni	Taksoni
Carstvo (Regnum)	Fungi	Fungi	Fungi	Fungi
Razdeo (Divisio)	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Klasa (Classis)	Lecanoromycetes	Lecanoromycetes	Lecanoromycetes	Lecanoromycetes
Red (Ordo)	Lecanorales	Lecanorales	Lecanorales	Lecanorales
Porodica (Familia)	Umbilicariaceae	Umbilicariaceae	Parmeliaceae	Parmeliaceae
Rod (Genus)	<i>Umbilicaria</i>	<i>Umbilicaria</i>	<i>Hypogymnia</i>	<i>Evernia</i>
Vrsta (Species)	<i>Umbilicaria crustulosa</i>	<i>Umbilicaria cylindrica</i>	<i>Hypogymnia tubulosa</i>	<i>Evernia prunastri</i>

Rod *Umbilicaria* obuhvata foliozne lišajeve koji se u narodnoj medicini koriste kao purgativi (laksativi). Naziv roda potiče od latinske reči *umbilicaris*-umbilikalni (od latinskog *umbilicus*-pupak). U literaturi se spominju pod nazivom „rock tripe” (<https://www.merriam-webster.com/dictionary/Umbilicaria>). Ovaj rod je rasprostranjen u severnoj hemisferi, Severnoj Americi, Evropi i Antartiku.

Umbilicaria crustulosa (Slika 1) poznata je pod sinonimima: korasti lišaj, *Gyrophora depressa* (Ach.) Schaer., *Omphalodiscus crustulosus* (Ach.) Schol., *Gyrophora crustulosa* Ach. kao i pod imenom „crusty navel lichen”. Raste na silikatnim stenama i spada u foliozne lišajeve. Gornja površina talusa je glatka i ravna, sive do braon sive boje a donja površina je smeđe boje. Prisutne su specifične rezinoidne strukture i substrukture poput grančica i areola sa prisutnim pukotinama (Slika 1).



Slika 1. *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey

(Lokalitet Stara planina, Babin zub, fotografisala Ivana Zrnzević)

U. cylindrica raste na silikatnim stenama, najčešće u alpskoj vegetacionoj zoni. Talus je nepravilnog oblika sa neravnim ivicama prišvršćen u jednoj tački i podeljen na više lobusa. Gornja površina je svetlo do srednje siva, glatka i oivičena crnim ivicama. Donja površina je glatka, bledo braon boje sa razgranatim belim rizomorfinima i crnim apotecijama (Slika 2). Po morfološkim osobinama pripada folioznim lišajevima (Nash i saradnici, 2004).

TEORIJSKE OSNOVE



Slika 2. *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise

(Lokalitet Stara planina, Babin zub, fotografisala Ivana Zrnzević)

Ime roda *Hypogymnia* potiče od grčkih reči *hypo* što znači ispod i *gymno*-goli, zbog odsustva rizina na donjem korteksu. Sinonimi za *H. tubulosa* su: praškasti cevasti lišaj, *Ceratophyllum tubulosum* (Schaer.) M. Choisy, *Hypogymnia physodes* var. *tubulosa* (Schaer.) Walt. Watson, *Hypogymnia tubulosa* f. *farinosa* (Hillmann) Rass. i *Hypogymnia tubulosa* f. *rugosorediosa* (Gyeln.) Rasanen. Njeno stanište je ograničeno na vlažne uslove i široko je rasprostranjena na kori kiselog drveća, uključujući četinare i listopadna stabla. Gornja površina talusa lišaja *H. tubulosa* je beličasta do zelenkasto siva, ponekad tamna. Medula je šuplja dok je donja površina crna i perforirana (Slika 3). Po morfološkim osobinama spada u grupu folioznih (listastih) lišajeva (Nash i saradnici, 2002).



Slika 3. *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav.

(Lokalitet Donje Vlase, severna padina Seličevice, fotografisao Bojan Zlatković)

Evernia prunastri poznatija kao hrastov lišaj ili šljivin lišaj, pripada porodici Parmeliaceae i rodu *Evernia*. Poznati sinonim je *Lichen prunastri* L. Rasprostranjena je u većem delu severne hemisfere i Centralne Evrope, prvenstveno na hrastovoj kori. Može se naći i na kori drugog listopadnog drveća i četinara kao što su jela i bor. Talus je kraći (3-4 cm dužine), razgranat i raste na kori u vidu traka. Gornja površina talusa *E. prunastri* je zelenkasta i gruba kada je suva a tamno maslinasta i gumena kada je vlažna. Donja površina je beličaste boje (Slika 4). Talus je foliozan ali pričvršćen u jednoj tački pa može da deluje kao da je frutikozan (Kosanac i saradnici, 2013). Smatra se da spada u lišajeve sa mešovitim tipom talusa koji ima radijalnu građu.



Slika 4. *Evernia prunastri* (L.) Ach.

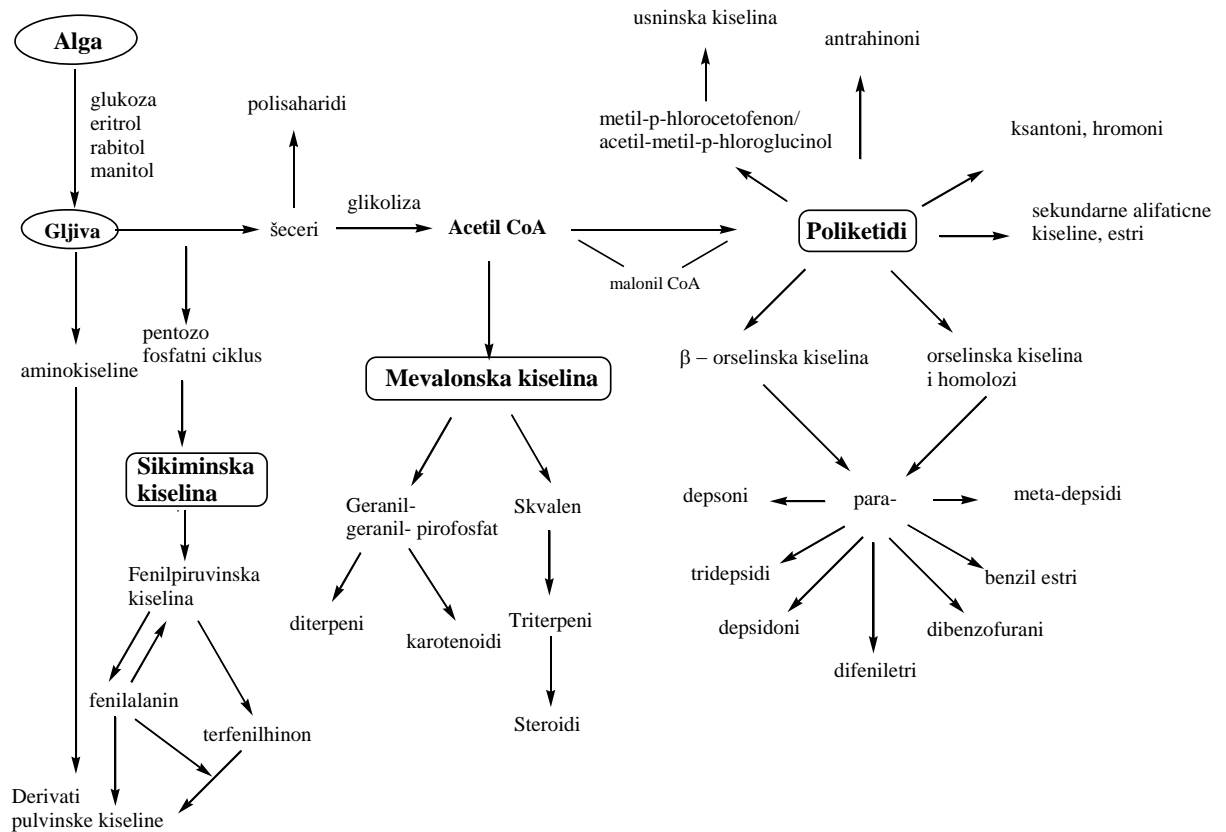
(Lokalitet Vlasinska visoravan, fotografisao Bojan Zlatković)

2.2. Lišajevske supstance, biosinteza i struktura

Lišajeve karakteriše prisustvo jedinstvenih sekundarnih metabolita koji u hemijskom pogledu pripadaju različitim klasama jedinjenja (depsidi, depsidoni, dibenzofuranska jedinjenja) jednim imenom nazvani lišajevske supstance. Depsidi, tridepsidi i tetradepsidi su najbrojnija klasa jedinjenja izolovana iz lišajeva. Sastoje se od dva, tri ili četiri ostatka hidroksibenzoeve kiseline povezana estarskom vezom. Druga najbrojnija klasa jedinjenja su depsidoni koji sadrže pored estarske i dodatnu etarsku vezu između aromatičnih prstenova. Monociklična aromatična jedinjenja depsida i depsidona su uglavnom derivati orcinola (5-metil-1,3-benzendiola) i β -orcinola (2,5-dimetil-1,3-benzendiola). Osim depsida i depsidona, lišajevi sintetišu i dibenzofuranske derivate i depsone.

Sekundarne metabolite sintetiše gljiva i akumulira ih u korteksu (atranorin, hloratranorin, usninska kiselina itd.) ili u meduli (fizodična kiselina, fizodalična kiselina, protocetrarična kiselina itd). Obično su to jedinjenja kristalne strukture deponovana na spoljašnjoj površini hifa i mogu biti izolovane iz matriksa lišaja korišćenjem različitih rastvarača. Ekstracelularni produkti relativno male molekulske mase jedinstveni za lišajeve poznatiji su i kao lišajevske kiseline. Strukture nekih su date u Tabeli 2.

TEORIJSKE OSNOVE

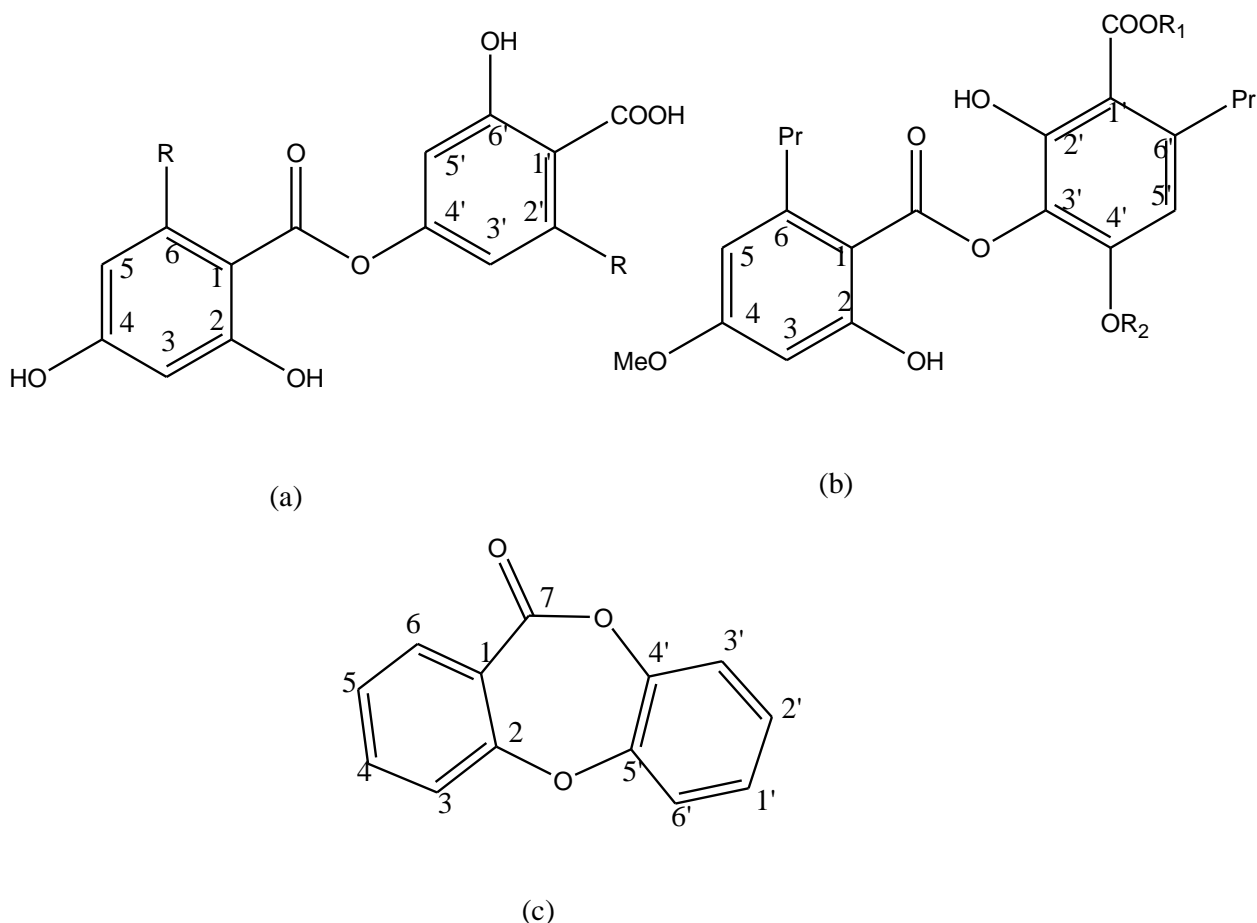


Slika 5. Biosintetski put nastajanja lišajevskih supstanci (prerađeno iz Elix, 1996).

Culberson i Elix (1989) su klasifikovali lišajevske supstance prema njihovom biosintetskom poreklu i strukturnim karakteristikama (Slika 5). Jedan deo supstanci nastaje iz acetil-polimalonatnog puta pri čemu se grade karakteristične grupe jedinjenja za lišajeve (depsidi, depsidoni, dibenzofurani), dok ostali metaboliti, koji se nalaze i kod biljaka, nastaju iz mevalonske i šikiminske kiseline. Biosintetskim putem mevalonske kiseline nastaju terpeni i steroidi izvedeni iz acetil koenzima A, dok putem šikiminske kiseline izvedeni iz pentozo fosfatnog ciklusa nastaju derivati pulvinske kiseline.

Depsidi lišajeva imaju primarno fenil-benzoatnu strukturu i najčešći tip su *para*-depsidi (Slika 6a) gde je β -prsten esterifikovan u položaju 4'-hidroksilne grupe. Međutim, postoje neki depsidi kod kojih je β -prsten podvrgnut daljoj hidroksilaciji (oksidaciji) i ovi *meta*-depsidi (Slika 6b) su esterifikovani u položaju 3'-hidroksilne grupe (Elix, 1975).

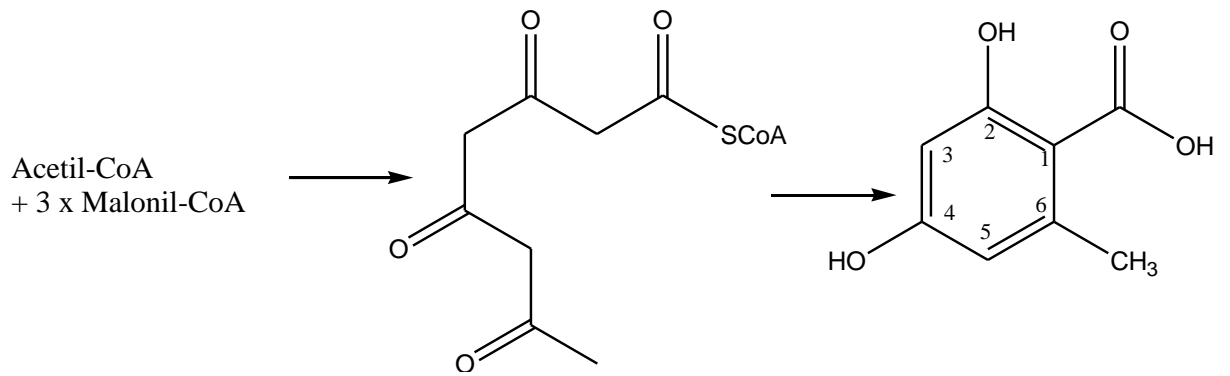
TEORIJSKE OSNOVE



Slika 6. Strukture *para*-depsida (a), *meta*-depsida (b) i depsidona (c)

Većina morfološki definisanih vrsta lišajeva ima konstantan hemijski sastav i karakteriše se prisustvom određene supstance u korteksu i jednom ili više supstanci u meduli (Huneck i Yoshimura, 1996). Monoaromatična komponenta koja se najčešće javlja u lišajevima je orselinska kiselina i njeni derivati. Orselinska kiselina je najjednostavnija poliketidna komponenta koja je takođe pronađena i kod nekih bakterija. Potrebne su tri kondenzacije malonil koenzima A da bi se formirao tetraketidni lanac praćen nestereospecifičnim (neenzimskim) uklanjanjem protona što vodi aldolnoj ciklizaciji na C3 i C5 atomima (Slika 7) (Woo i saradnici, 1989).

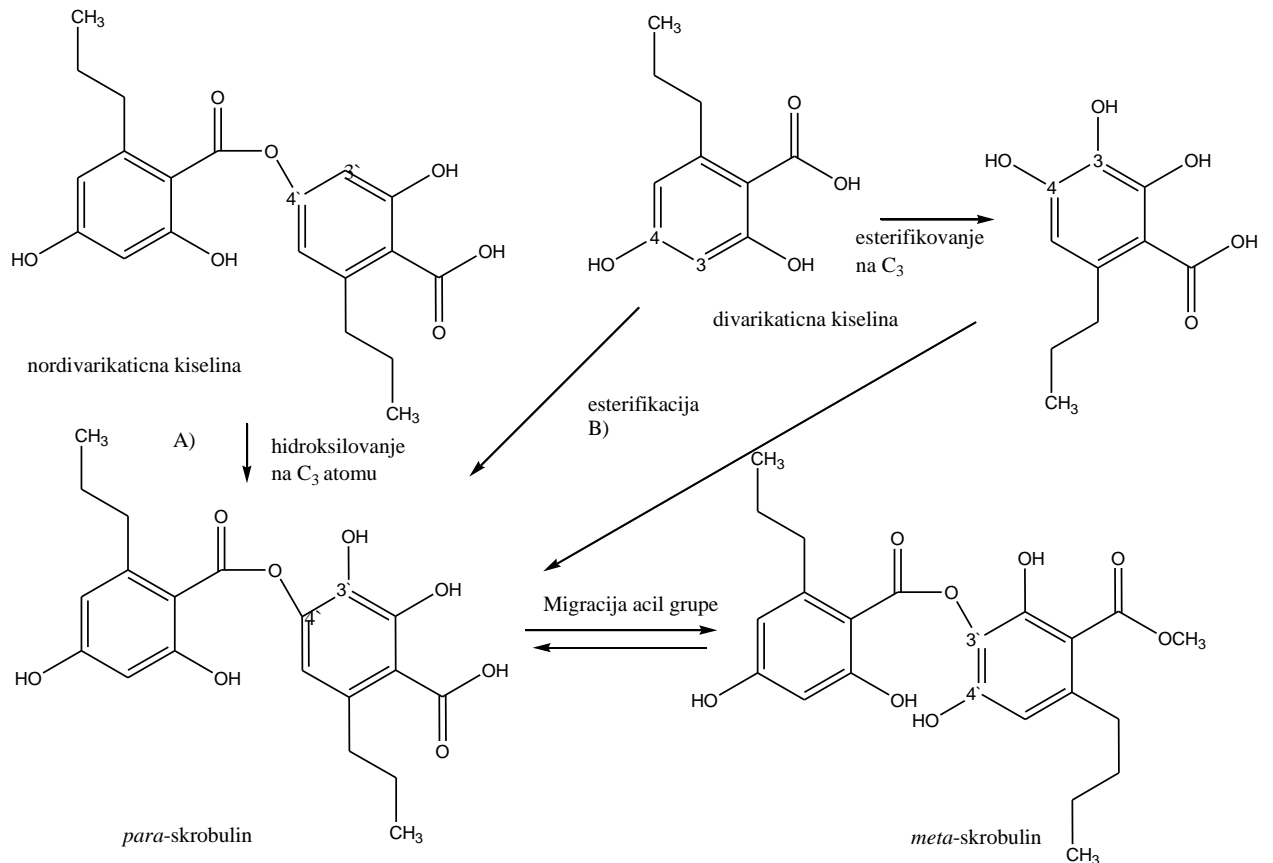
TEORIJSKE OSNOVE



Slika 7. Sinteza orselinske kiseline iz prekursora acetil koenzima A i malonil koenzima A (prerađeno iz Woo i saradnici, 1989)

Najzastupljenija jedinjenja detektovana u lišajevima *Umbilicaria* vrste su didepsid i tridepsid, lekanorna i giroforna kiselina, koje se sastoje od dva i tri ostatka orselinske kiseline spojena estraskom vezom u *para* položaju. Krustinska kiselina je izuzetak, jer ima estarsku vezu u *meta* položaju trećeg prstena (strukture su date u Tabeli 2). Do sada nije utvrđen put sinteze *meta*-depsida. Interkonverzija i istovremeno postojanje *meta* i *para*-skrobulina koji postoje u dinamičkoj ravnoteži u vrsti *Lobaria scrobiculata* vode hipotezi da se *meta*-depsidi formiraju od *para*-depsida preko intramolekulskog preuredjivanja nakon hidroksilacije ugljenika u *meta* položaju B-prstena (Slika 8) (Elix i Gaul, 1986).

TEORIJSKE OSNOVE



Slika 8. Biosinteza *para* i *meta*-skrobulina A) put hidroksilovanja nordivarikatične kiseline na C₃ atomu do *para*-skrobulina B) put hidroksilovanja divarikatične kiseline praćeno intramolekulskom esterifikacijom do *para*-skrobulina (prerađeno iz Elix i Norfolk, 1975)

Sinteza depsidne veze direktnom esterifikacijom aromatične karboksilne kiseline odgovarajućim fenolom moguća je uz upotrebu kondenzirajućih agenasa kao što su dicikloheksilkarbodiimid, trifluoroacetanhidrid i N,N–karbonildiimidazol. Ovi reagensi su korišćeni isključivo za sintezu *para*-depsida (Elix i Norfolk, 1975).

Posner i saradnici (1992) su prijavili 3 različita hemotipa lišaja *U. crustulosa* koji nisu povezani sa morfološkim karakteristikama, a odlikuju se prisustvom giroforne kiseline kao glavne komponente:

- Hemotip a) koji sadrži girofornu kiselinu (tridepsid) praćenu lekanornom kiselinom (didepsid) i hiaskičnom kiselinom (tridepsid);
- Hemotip b) koga karakteriše prisustvo giroforne kiseline praćene lekanornom, hiaskičnom (“hiascic”) i krustinskom kiselinom (tridepsid);

TEORIJSKE OSNOVE

- Hemotip c) koji sadrži pored giroforne kiseline i lekanornu, hiaskičnu, krustinsku kiselinu i atranorin kao sporedne komponente.

Serina i Arroyo (1996) su izvršili podelu na 2 hemotipa:

- Giroforni hemotip koji sadrži girofornu kiselinu kao glavnu komponentu ($89,8 \pm 5,4\%$) praćenu lekanornom kiselinom ($4,5 \pm 1,5\%$) i krustinskom kiselinom ($4,2 \pm 3,3\%$);
- Hemotip krustinske kiseline koga karakteriše krustinska kiselina kao glavna komponenta ($78,6 \pm 6,9\%$) % praćena lekanornom ($7,0 \pm 2,2\%$) i girofornom kiselinom ($13,9 \pm 5,8\%$).

Krustinska kiselina je glavni sekundarni metabolit u 46% uzoraka iz Španije od ukupno 56 analiziranih *U. crustulosa* uzoraka (Serina i Arroyo, 1996).

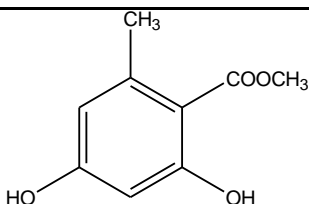
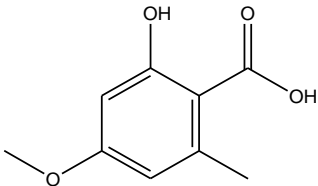
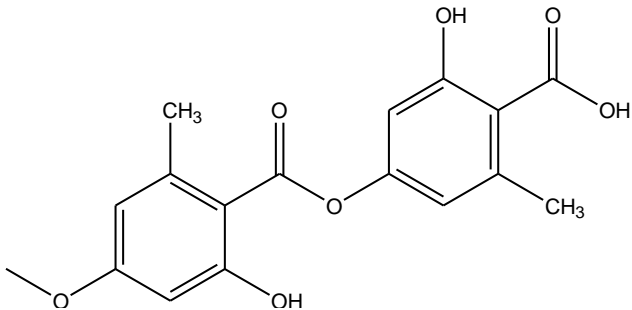
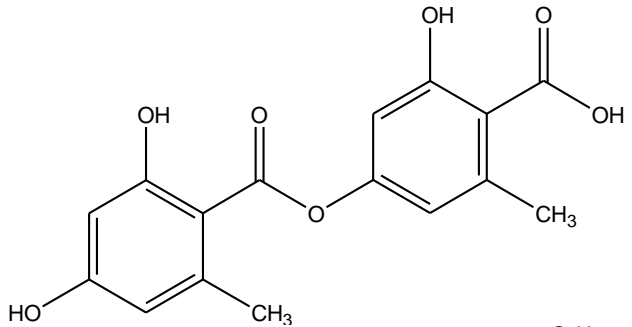
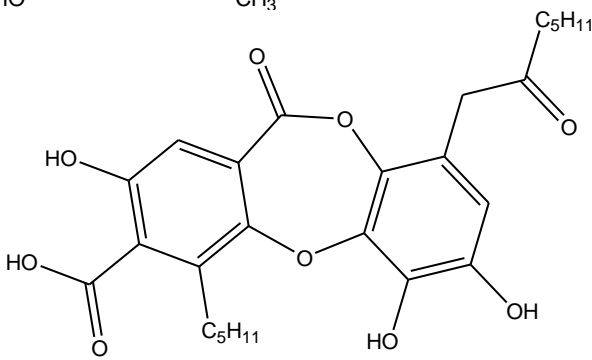
Umbilicaria cylindrica (Slika 2) se pojavljuje u 2 različita hemotipa (Huneck, 1991), jedan bez lišajevskih supstanci i drugi koji se karakteriše norstiktik kiselinom kao glavnom komponentom i konnorstiktik kiselinom u 10 puta manjoj količini. Skorašnja istraživanja *U. cylindrica* uzoraka iz Srbije (Manojlović i saradnici, 2011) su pokazala prisustvo salazinske kiseline, norstiktik kiseline, metil- β -orcinol karboksilata, etil-hematomata, usninske kiseline i atranorina kao glavnih komponenti metanolnog i hloroformskog ekstrakta.

Rod *Hypogymnia* proizvodi metabolite iz grupe orcinol depsidona, a najzastupljeniji su fizodična i 3-hidroksifizodična kiselina. Pored toga, proizvodi β -orcinol depside, atranorin i hloratranorin (Tabela 2). Svi depsidoni sadrže 11H-dibenzo[b,e][1,4]dioksepinski-11-on-ski skelet (Slika 6c) koji je supstituisan u različitim pozicijama. Najzastupljeniji sekundarni metaboliti *H. tubulosa* su fizodična kiselina, praćena 3-hidroksifizodičnom kiselinom i 2'-O-metilfizodičnom kiselinom lociranim u meduli i atranorin i hloratranorin locirani u gornjem korteksu (Nash i saradnici, 2002).

Vrstu *E. prunastri* karakteriše prisustvo usninske kiseline, atranorina i hloratranorina u gornjem korteksu kao i evernične kiseline u meduli (Culberson 1963) (Tabela 2). U radu Joulain-a i Tabacchi-ja (2008) se navodi da je u „oakmoss” ekstraktu identifikovano oko 170 konstituenata a među njima 47 depsida, 25 triterpena i steroida.

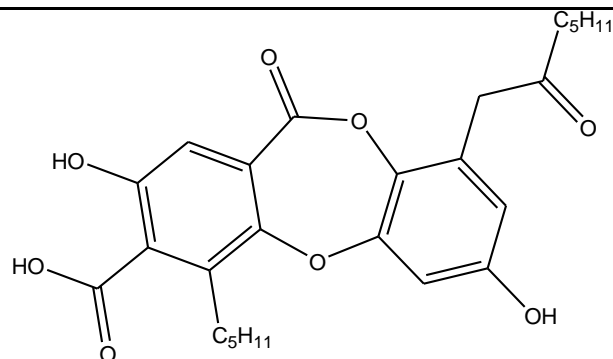
TEORIJSKE OSNOVE

Tabela 2. Trivijalna imena, hemijska imena i strukture jedinjenja izolovanih iz lišajeva *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *H. tubulosa* i *E. prunastri*

Trivijalno ime	Struktura	IUPAC ime
Metil orselinat		Metil- 2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat
Everninična kiselina		2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoeva kiselina
Evernična kiselina		2-hidroksi-4-(2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoil)oksi-6-metilbenzoeva kiselina
Lekanorna kiselina		2-hidroksi-4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-6-metilbenzoeva kiselina
3-hidroksi fizodična kiselina		3,9-dihidroksi-6-okso-7-(2-oksoheptil)-1-pentilbenzo[b][1,4]benzodioxepin-2-karboksilna kiselina

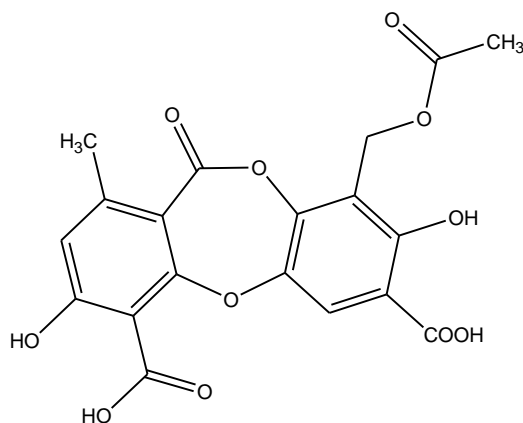
TEORIJSKE OSNOVE

**Fizodična
kiselina**



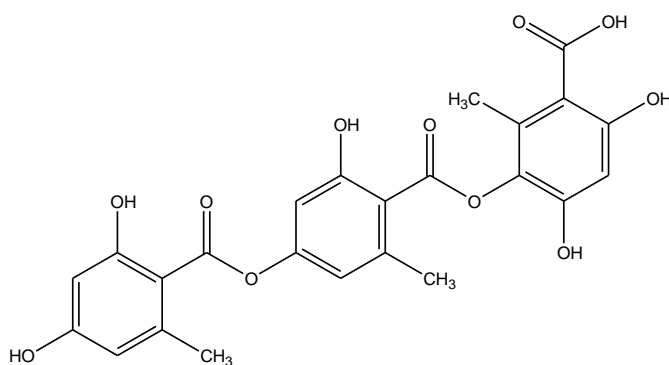
3,9-dihidroksi-6-okso-7-(2-oksoheptil)-1-pentilbenzo[b][1,4]benzodioxepin-2-karboksilna kiselina

**Fizodalična
kiselina**



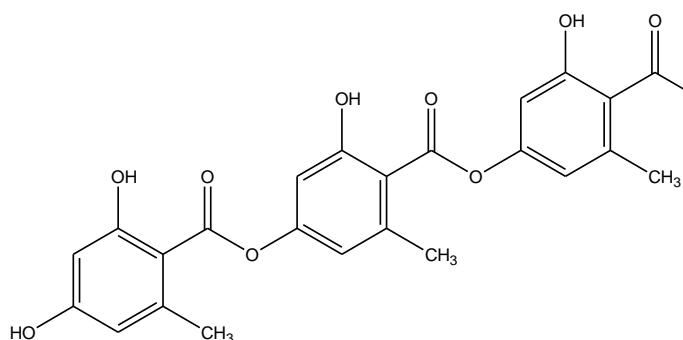
4-(acetiloksimetil)-10-formil-3,9-dihidroksi-1,7-dimetil-6-oksobenzo[b][1,4]benzodioxepin-2-karboksilna kiselina

**Krustinska
kiselina**



3-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-4,6-dihidroksi-2-metilbenzoeva kiselina

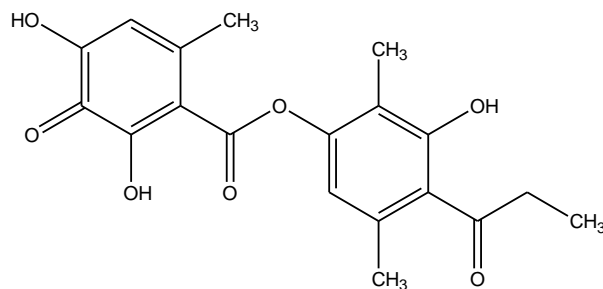
**Giroforna
kiselina**



4-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoeva kiselina

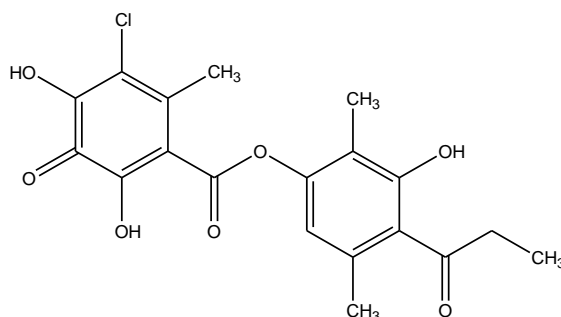
TEORIJSKE OSNOVE

Atranorin



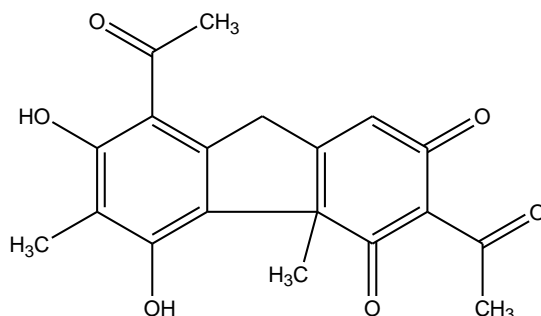
(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil) 3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat

Hloratranorin



(3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil) 5-hloro-3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat

**Usninska
kiselina**



2,6-diacetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetildibenzofuran-1,3-dion

2.3. Instrumentalne metode analize: HPLC, GC-MS, ICP-OES

2.3.1. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom, HPLC

Hromatografija je fizička metoda razdvajanja kvalitativnog i kvantitativnog određivanja komponenata smeše njihovom raspodelom između dve faze.

Podela hromatografije izvršena je prvenstveno prema fizičkom stanju mobilne faze, na tečnu (LC, "Liquid Chromatography"), gasnu (GC, "Gas Chromatography") i superkritičnu fluidnu hromatografiju (SFC, "supercritical fluid chromatography"). U zavisnosti od fizičkog stanja mobilne i stacionarne faze, hromatografija može biti: tečno-tečna (LLC), tečno-čvrsta (LSC), gasno-čvrsta (GSC) i gasno-tečna (GLC). Hromatografija se može podeliti i prema načinu smeštanja stacionarne faze na planarnu hromatografiju (u ravni) i hromatografiju u koloni. U zavisnosti od fizičko-hemijskih procesa koji se odigravaju između komponenti smeše i faza izvršena je podela na particionu (apsorpciona), adsorpcionu, jonoizmenjivačku i gel (ekskluziona) hromatografiju.

TEORIJSKE OSNOVE

Informacije dobijene pri hromatografisanju sadržane su u hromatogramu. Položaj svakog pika u hromatogramu je karakterističan za identitet komponente, a područje ispod pika je funkcija količine svake komponente.

Kolone za LC (tečnu hromatografiju) punjene su česticama malih dimenzija sa velikom gustinom pakovanja, što je neophodan preduslov zbog visokih pritisaka koji su potrebni za izvođenje ove tehnike. Koriste se dva tipa kolona, analitičke i preparativne, u zavisnosti od dužine i prečnika kolone. Kolone za LC se prave od čelika, stakla ili njihove kombinacije, dužina kolone je od 3 do 25 cm a prečnik je u opsegu 1-5 mm. Efikasnost po jedinici dužine pakovane kolone u LC se povećava sa smanjenjem dimenzija čestica kolone. Takođe efikasnost se može povećati korišćenjem rastvarača niske viskoznosti. Uobičajeni prečnik kolone kod analitičke LC je 3-5 mm što je postala standardna dimenzija, iako su se kapaciteti instrumenta vremenom povećavali. Kapilarne kolone unutrašnjeg prečnika 0,1-0,5 mm pakovane česticama veličine 3-10 μm sa relativno velikim dužinama se mogu koristiti za odvajanje složenih smeša gde je potreban veliki broj teorijskih podova. Teorijski pod predstavlja zamišljeni deo kolone u kome se uspostavlja idealna ravnoteža komponente između stacionarne i mobilne faze, prema koeficijentu distribucije. Rad ovih kolona je i dalje ograničen pritiskom. Vreme odvajanja veće je za red veličine nego kod gasne hromatografije (GC). Visoki pritisak obezbeđuje se pumpama. Obično je jedna dovoljna kod izokratskog režima eluiranja, dok se kod gradijentnog režima eluiranja koriste nezavisne paralelene pumpe, obično dve kod binarnih sistema, za pumpanje različitih rastvarača u komore za mešanje. Komponente mobilne faze se skladište u bocama i povezane su sa uređajem za degaziranje. Skraćenica HPLC je nastala od dva izraza: tečna hromatografija pod visokim pritiskom (High Pressure Liquid Chromatography) i tečna hromatografija visokih mogućnosti (High Performance Liquid Chromatography). Oba su adekvatna zato što kod HPLC metode eluiranje se vrši pod visokim pritiskom što omogućava efikasno razdvajanje komponenti smeše. HPLC metoda nalazi široku primenu u analizi prirodnih proizvoda i biomakromolekula koji se odlikuju visokom polarnošću, velikom molekulskom masom, prisustvom jonskih grupa i termalnom nestabilnošću, gde druge tehnike ispoljavaju nedostatke. Injektovanje uzorka se vrši preko autosemplera. Injektor je smešten blizu vrha kolone i omogućava injektovanje poznatih zapremina uzorka ekvivalentnih zapremini injekcione petlje, koje se inektovanjem ubacuju u mobilnu fazu pod pritiskom rotiranjem ventila koji menja put mobilne faze.

Tečna mobilna faza se nalazi u rezervoarima (uobičajeno dva rezervoara) koji su izgrađeni od stakla, nerđajućeg čelika ili plastike. Mobilna faza se degazira odnosno oslobađa

TEORIJSKE OSNOVE

gasova koji su u njoj rastvoreni. Iz rezervoara, mobilna faza se usmerava u deo gde se mobilne faze mešaju (mešač) čime se obezbeđuje željeni sastav mobilne faze. Ako se tokom eluiranja koristi samo jedna mobilna faza istog sastava, eluiranje je izokratsko. Ako se sastav mobilne faze menja tokom eluiranja, u pitanju je gradijentno eluiranje.

Mobilnu fazu pokreću pumpe koje mogu stvarati visok pritisak, reda veličine 10^6 Pa, koje su osposobljene za kontinualnu promenu brzine mobilne faze. Uzorak nakon ubacivanja kroz injekcioni blok ulazi u mobilnu fazu pod visokim pritiskom, podleže razdvajanju na koloni, zatim detekciji i na kraju analizi ili takozvanom "hvatanju" komponenti ukoliko se radi o preparativnoj HPLC. Preparativna hromatografija se koristi za izolovanje čistih supstanci iz smeše jedinjenja dok se analitička hromatografija koristi za identifikaciju supstanci i njihovo kvantitativno određivanje.

Stacionarnu fazu čine adsorbenti koji mogu biti porozni i neporozni. Porozni adsorbenti imaju veću dodirnu površinu, odnosno veći broj aktivnih centara preko kojih vezuju funkcionalne grupe komponenata koje treba razdvojiti. Što adsorbent poseduje veći broj aktivnih centara, to ima veću sposobnost da adsorbuje komponente iz smeše. Adsorbenti mogu biti nepolarni (aktivni uglj, polistiren, divinilbenzen) i polarni od kojih su najviše u upotrebi silikagel, koji sadrži kisele grupe i aluminijum-oksidi koji sadrže bazne grupe..

Silikagel ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$) je jedan od najčešće upotrebljivanih adsorbentata u hromatografiji čija specifična površina iznosi $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Osnovnu strukturu ovog adsorbenta čine tetraedri silicijuma i kiseonika, čiji polimeri obrazuju poroznu strukturu. Za adsorpciju su od značaja hidroksilne grupe vezane za silicijum koje grade adsorpcionu površinu. Mehanizam adsorpcije podrazumeva stvaranje vodoničnih veza između hidroksilnih grupa silikagela i komponenata kao i interakciju dipol-dipol.

Iako se većina odvajanja vrši pri sobnoj temperaturi, nekada se kolona ili ceo sistem rastvarača termostiraju. U zavisnosti od korišćenog detektora, identifikacija komponenti se bazira na hemijskoj strukturi, molekularnoj masi ili nekom drugom parametru, pri čemu je princip rada detektora zasnovan na apsorpciji UV i VIS zračenja, fluorescenciji, refraktometriji i amperometriji. Analitički detektori se dizajniraju tako da imaju veću selektivnost, dok preparativni detektori imaju veći kapacitet, tako da se ne mogu zameniti čak i kada rade po istom principu.

Najširu upotrebu imaju UV detektori, koji kao izvor zračenja koriste deuterijumsku lampu sa emisijom spektra zračenja u oblasti od 200 do 700 nm. Za većinu organskih jedinjenja oblast od interesa je u opsegu od 200 do 400 nm. Komponenti koja se eluiraju sa kolone meri se apsorbanca, koja je prema Lambert-Beerovom zakonu, srazmerna njenoj

TEORIJSKE OSNOVE

koncentraciji. Apsorbanca se može meriti na fiksnoj talasnoj dužini (na 254 nm ako se kao izvor zračenja koristi živina lampa) ili na više talasnih dužina (ako se kao izvor zračenja koristi volframova ili deuterijumska lampa). Mogu se koristiti i višekanalni spektrofotometri, što znači da je moguće istovremeno snimanje na više talasnih dužina. Na ovaj način se smanjuje verovatnoća da neka komponenta ne bude registrovana zbog eventualno male apsorpcije na jednoj talasnoj dužini (Myers, 2000).

HPLC se primenjuje za odvajanje hemijskih i bioloških komponenata koje nisu isparljive. Zbog prirode lišajevskih supstanci analiza ekstrakata se uglavnom radi primenom tačne hromatografije na visokim pritiscima. Strukture identifikovanih supstanci u ranije ispitivanim lišajevima date su u Tabeli 2.

Zahvaljujući UV detektoru omogućeno je poređenje UV spektara izdvojenih komponenti sa standardima, što predstavlja potvrdu strukture detektovanih komponenti. Maksimum UV spektara depsida orcinol tipa se nalazi između 207-225 nm, 254-275 nm i 282-318 nm. Za depsidone orcinol tipa UV maksimum varira u opsegu 208-224 nm, 250-270 nm i 300-333 nm. Depsidoni sa aldehidnom grupu u položaju 3 pokazuju maksimum u opsegu 211-216 nm, 234-242 nm i 310-321 nm. Dibenzofurani se karakterišu UV maksimumima u opsegu 236-249 nm, 256-274 nm i 310-330 nm. Maksimumi UV spektara usninske kiseline su na 220-232 nm, 282-290 nm i 325-340 nm (Huneck i Yoshimura, 1996).

Prilikom kvantifikacije komponenti u smeši treba voditi računa da izračunate površine pikova predstavljaju meru relativnih koncentracija komponenata u smeši. Ukoliko se žele i apsolutne koncentracije komponenata potrebno je napraviti kalibracionu krivu sa poznatim koncentracijama odgovarajućih komponenti.

2.3.2. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom, GC-MS

Gasna hromatografija omogućava odvajanje komponenata smeše u gasnoj fazi na osnovu njihove različite raspodele u stanju ravnoteže između dve faze. Mobilna faza je gasna i kreće se u određenom smeru zajedno sa parama jedinjenja koje se odvajaju. Stacionarna faza može biti tečna ili čvrsta, na osnovu čega se razlikuje hromatografija gas-tečno (GLC) i hromatografija gas-čvrsto (GSC). Kod gas-tečne hromatografije stacionarna faza je kapilarni sloj tečnosti ravnomerno raspoređen po inertnom nosaču (u pakovanim kolonama) ili po unutrašnjem zidu kolone (kod kapilarnih kolona). Tehnika se primenjuje samo za ona jedinjenja koja se nalaze u gasovitom stanju ili se pogodnim metodama mogu prevesti u gasovito stanje.

TEORIJSKE OSNOVE

Kod hromatografije gas-čvrsto stacionarna faza je aktivna čvrsta supstanca, kao što je silikagel, aluminijum-oksidi, aktivni ugalj ili polimer na kome se jedinjenja razdvajaju putem selektivne adsorpcije. Gas-čvrsto hromatografija se koristi pri razdvajanju komponenata koje se ne zadržavaju u kolonama sa tečnom stacionarnom fazom, kao što su ugljovodonici male molekulske mase. Kod čvrste stacionarne faze odvajanje se zasniva na adsorpcionim afinitetima između molekula uzorka i površine čvrste faze, odnosno na mehanizmu adsorpcije, dok kod tečne stacionarne faze odvajanje zavisi od rastvorljivosti molekula uzorka u tečnoj stacionarnoj fazi - mehanizam podeone hromatografije.

Specijalnim mikro špricom uzorak se ubacuje u zagrejeni injektor. Kroz injektor koji je zagrejan na temperaturi dovoljnoj da dovede do trenutnog isparavanja unetog uzorka protiče struja nosećeg gasa konstantnog protoka. Ovaj gas nosi ispareni uzorak u kolonu. Smeša komponenti se raspodeljuje između stacionarne i mobilne faze (gasa nosioca) saglasno razlikama u njihovim koeficijentima raspodele. Tečna faza selektivno zadržava komponente smeše tako da dolazi do njihovog razdvajanja. Po izlasku iz kolone razdvojene komponente zajedno sa strujom nosećeg gasa prolaze kroz detektor, proizvodeći u njemu odgovarajući signal. Intenzitet ovog signala u zavisnosti od vremena se beleži pomoću pisara i kriva koja se dobija naziva se hromatogram.

Mobilna faza ili noseći gas utiču na efikasnost razdvajanja, vreme analize i osetljivost detektora, pa se njegovom odabiru posvećuje velika pažnja. Bitno je da sve karakteristike gasa nosača ostanu konstantne (što je moguće više) tokom kretanja kroz aparaturu. Kao gasovi nosači koriste se: helijum, azot, argon i vodonik, ređe ugljen-dioksid, kiseonik i vazduh. Gasovi moraju biti hemijski inertni prema analitima, malog viskoziteta, niske cene i odlikovati se velikom čistoćom (99,99%) i dobrom termičkom provodljivošću (ukoliko se koristi detektor termičke provodljivosti). Obično se čuvaju u bocama od 40 dm³, pod pritiskom od 15 MPa, osim CO₂, koji se čuva pod pritiskom od 6 MPa.

Kolona se nalazi u komori koja se greje i jednim krajem je povezana sa zagrejanim injektorskim ulazom, a drugim krajem sa zagrejanom detektorskom jedinicom koja prikazuje izlazne komponente.

Hromatografski detektor je uređaj koji se nalazi u sklopu gasnog hromatografa, a povezan je sa izlaznim krajem kolone. Zavisno od fizičke veličine koju detektuju detektori se dele na jonizacione, elektrohemijske i optičke detektore. Na osnovu opsega komponenti koje detektuju detektori se dele na univerzalne, selektivne i specifične. Plameno-jonizacioni detektori (FID) i detektori termalne provodljivosti (TCD) su primeri univerzalnih detektora; plameno-fotometrijski, termo-jonizacioni, atomsko-emisioni detektori su element-selektivni

TEORIJSKE OSNOVE

detektori; fotojonizacioni detektori i detektori sa elektronskim zahvatom su strukturno-selektivni detektori.

Zbog velike efikasnosti pri odvajanju, brzine analize i veoma osetljivih detektora GC a posebno GC na kapilarnim kolonama je tehnika izbora sa širokim opsegom primene za analizu mnogih komponenata. Osnovni uslovi koji moraju biti ispunjeni su da analizirane komponente budu isparljive i temperaturno stabilne. Sem za detekciju, GC se koristi i za strukturno određivanje u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MS) (Jennings, 2000).

Maseni spektar je grafički prikaz količine jona u zavisnosti od odnosa mase i naelektrisanja (m/z). Princip masene spektrometrije zasniva se na jonizaciji uzorka i odvajanju nastalih jona u vakuumu korišćenjem električnog ili magnetnog polja, ili i jednog i drugog. Iako postoje dostupne biblioteke sa fragmentacijom određenih molekula pažljivo razmatranje i analiza su neophodni pri potpunoj identifikaciji komponenata smeše.

Osnovni preduslov za ovu metodu je stvaranje uslova visokog vakuma (106 Pa) kako bi se odvijala jonizacija i adekvatno razdvajanje jona. Maseni spektrometar se sastoji od sistema za injektovanje, jonskog izvora, masenog analizatora, sistema vakum pumpi i sistema za detekciju. Kuplovanjem sa gasnim hromatografom komponente koje su razdvojene gasnom hromatografijom se uvode u maseni spektrometar pri čemu sistemi slavina i ventila omogućavaju unos uzorka sa atmosferskog pritiska u vakuum.

Snimanje masenih spektara se može vršiti Scan-metodom (što podrazumeva snimanje kompletnog masenog spektra) ili SIM metodom (Selected Ion Monitoring) pri čemu se detektuju m/z vrednosti samo odabranih jona posmatranog molekula.

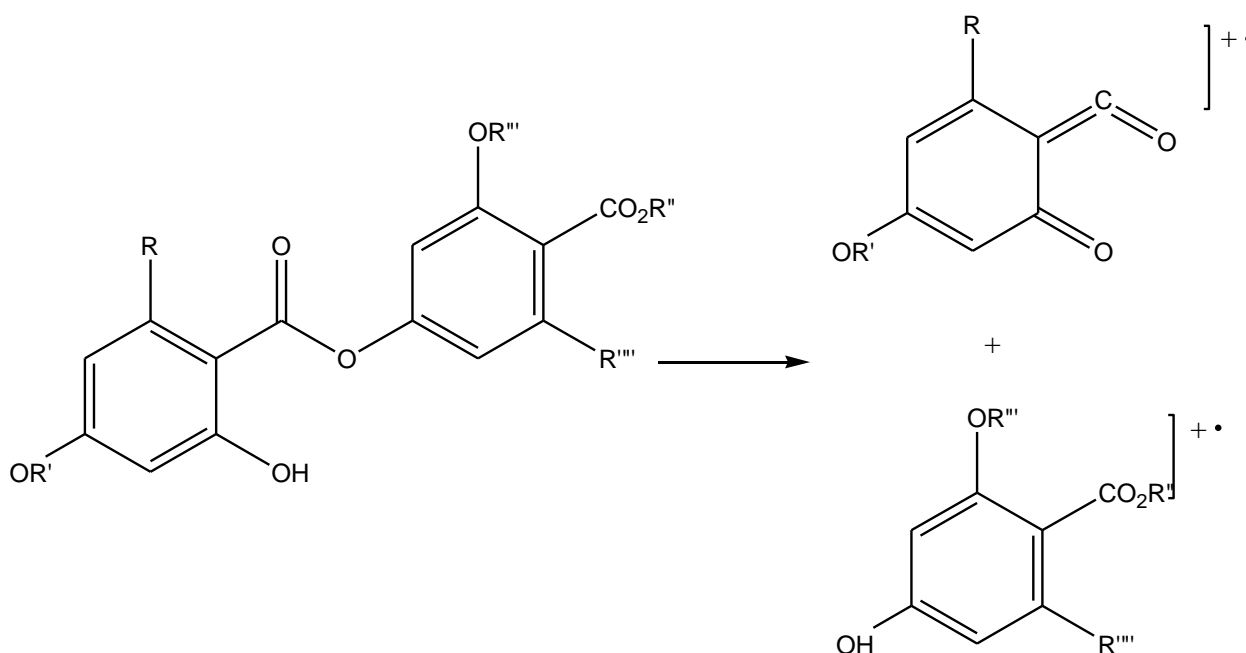
Način jonizacije zavisi od jonskog izvora a mogu se koristiti sledeće tehnike: elektronska jonizacija (EI, electron ionisation), hemijska jonizacija (CI, chemical ionisation), hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (APCI, atmospheric-pressure chemical ionization), bombardovanje brzim atomima (FAB, fast atom bombardment), elektron sprej jonizacija (ESI, electrosprey ionisation), matriksom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija (MALDI, matrix assisted laser desorption/ ionisation).

Nastali joni se odvajaju u masenom analizatoru na osnovu odnosa mase i naelektrisanja, a zatim se usmeravaju ka detektoru koji je najčešće elektronski multiplikator. Kao odgovor detektora beleži se totalna jonska struja (TIC) ili parcijalna jonska struja pri čemu su struje proporcionalne broju jona (ili samo jednog jona), koji padnu na detektor. Kao rezultat analize masenom spektrometrijom dobija se maseni spektar gde ordinata predstavlja relativni intenzitet izražen u procentima, a apcisa m/z . Spektar sadrži niz pikova od kojih

TEORIJSKE OSNOVE

svaki odgovara određenoj jonskoj vrsti i nalazi se na određenoj m/z vrednosti (Kuntić V, 2009).

Uz svaki maseni spektar neophodno je navesti uslove snimanja kako bi se spektar mogao koristiti pri identifikaciji s obzirom da na izgled spektra utiču mnogi faktori (temperatura jonskog izvora, vrsta jonizacije). Masena spektrometrija je korisna metoda za identifikaciju i strukturno određivanje lišajevskih supstanci. Ispitivanja lišajeva od strane Huneck-a i Yoshimura (1996) su pokazala da je glavni fragmentacioni put kod depsida raskidanje depsidne veze kao što je pokazano na Slici 9.



Slika 9. Fragmentacija depsida (prerađeno iz Huneck i Yoshimura, 1996)

2.3.3. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom, ICP-OES

Atomska emisiona spektrometrija je jedna od najmoćnijih analitičkih tehnika za određivanje tragova elemenata u različitim uzorcima. U pitanju je metoda emisione spektrohemijske analize koja koristi induktivno spregnutu plazmu kao izvor pobuđivanja u kombinaciji sa spektrometrom. Zahvaljujući visokoj temperaturi plazme, može se koristiti za određivanje svih elemenata periodnog sistema izuzev argona. Kao izvor za pobuđivanje koristi induktivno spregnutu plazmu (ICP, Inductively Coupled Plasma) koja radi na atmosferskom pritisku, a održava se induktivnim sprezanjem sa radiofrekventnim elektromagnetnim poljem. Koristi se bezelektrodna argonska, ređe, azotna plazma. Plazmenik se sastoji od tri koncentrične kvarcne cevi u kojima struji argon. Tehnika se zasniva na

spontanoj emisiji fotona od atoma i jona pobuđenih radiofrekventnim zračenjem. Tečni i gasoviti uzorci mogu biti direktno injektovani u aparat, dok se čvrsti uzorci moraju najpre prevesti u rastvor različitim postupcima digestije. Rastvor uzorka se prevodi u aerosol i usmerava u centralni kanal plazme gde aerosol brzo isparava usled visoke temperature. Na ovaj način se elementi prisutni u uzorku prevode u slobodne atome u gasovitom stanju. Usled sudara sa brzim elektronima argonske plazme atomi dobijaju dovoljno energije da pređu u pobuđeno stanje. Pobuđeni atomi i joni pri vraćanju u osnovno stanje emituju fotone, a talasna dužina emitovanih fotona se koristi za identifikaciju elemenata u uzorku. Ukupni broj fotona je direktno proporcionalan koncentraciji elementa u uzorku (Xiandeng, 2000).

2.4. Antioksidativna aktivnost

Slobodni radikali mogu da vrše oksidaciju proteina, nukleinskih kiselina kao i nezasićenih masnih kiselina u ćelijama i membranama, usled čega se njihovo prisustvo povezuje sa nastankom mnogih bolesti kao što su Alchajmerova bolest, emfizem pluća, arterioskleroza, Parkinsonova bolest, različiti oblici kancera. Živi organizmi su razvili odbrambene mehanizme kako bi se zaštitili od uticaja reaktivnih kiseoničnih vrsta na dva načina, inhibicijom formiranja slobodnih radikala ili njihovim vezivanjem. Oksidativni stres je kompleksan patofiziološki mehanizam koji se odnosi na narušen homeostatski oksidativno-reduktivni status ćelija organizma koji može da dovede do brojnih posledica. U procesu odbrane od oksidativnog stresa značajnu ulogu imaju flavonoidi čija je aktivnost povezana sa prisustvom reaktivnih fenolnih grupa (Hidalgo i saradnici, 1994).

2.4.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita

Ispitivanja lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita su pokazala značajne rezultate u pogledu antioksidativne aktivnosti. Oksidativni stres se dešava i u talusu lišajeva gde sekundarni metaboliti obezbeđuju zaštitu od slobodnih radikala nastalih usled UV radijacije (Molanar i Farkas, 2010). Hidalgo i saradnici (1994) su utvrdili aktivnost depsida atranorina i depsidona panarina, pri čemu se pokazalo da je antioksidativna aktivnost depsidona veća. Bacukoglu i saradnici (2013) su primenom DPPH metode ispitivali antioksidativnu aktivnost 6 vrsta metanolnih ekstrakata roda *Umbilicaria* među kojima je i *U. cylindrica* kao i lišajevskih kiselina izolovanih iz ovih vrsta lišajeva. Pokazalo se da izolovani metaboliti ispoljavaju veću antioksidativnu aktivnost od ispitivanih ekstrakata. Najjaču aktivnost je ispoljila umbilikarična kiselina, a zatim giroforna i lekanorna kiselina, a najslabiju aktivnost pokazali su ekstrakti. Manojlović i saradnici (2011) su utvrdili jaku antioksidativnu aktivnost

TEORIJSKE OSNOVE

metanolnog i hloroformskog ekstrakta lišaja *U. cylindrica*. Kosanić i saradnici (2014) su zabeležili umerenu antioksidativnu aktivnost metanolnog ekstrakta *U. crustulosa*. Acetonski i metanolni ekstrakt *E. prunastri* kao i izolovana evernična kiselina ispoljili su antioksidativnu aktivnost u *in vitro* eksperimentima (Kosanić i saradnici 2013, Mitrović i saradnici 2011). Metanolni ekstrakt *H. physodes* je u nekoliko studija pokazao visoku antioksidativnu aktivnost kao i fizodična kiselina izolovana iz ovog ekstrakta (Stojanović i saradnici 2010, Mitrović i saradnici 2011). Neke fenolne komponente kao što su metil-orselinat, orselinska kiselina, atranorin, lekanorna kiselina pokazuju umerenu antioksidativnu aktivnost (Bućukoglu i saradnici, 2013).

2.4.2. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti

Određivanje ukupnog sadržaja fenola (Total Phenolic Content - TPC) vršeno je po metodi predloženoj od strane Singleton i Orthofer-a (1999) korišćenjem Folin–Ciocalteu reagensa koji predstavlja smešu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Fenolne komponente redukuju Folin–Ciocalteu reagens u alkalnoj sredini formirajući plavo obojeni kompleks. Koncentracije nastalog kompleksa se određuje merenjem absorbance na 750 nm.

Sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala određivana je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i ABTS (2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat)) metodom.

Aktivnost uzorka DPPH metodom se detektuje snimanjem intenziteta apsorpcije koja potiče od DPPH radikala (DPPH^{*}) na 515 nm. Reakcijom DPPH radikala sa uzorkom smanjuje se intenzitet apsorpcije na 515 nm, jer DPPH^{*} (ljubičasta boja) reakcijom sa uzorkom formira DPPH-H (žuta boja) (Lee i saradnici, 1998).

ABTS metoda se zasniva na redukciji ABTS radikal katjona (ABTS^{•+}) antioksidansom i nastajanju neutralnog bezbojnog oblika ABTS, pri čemu je smanjenje intenziteta boje srazmerno količini prisutnih antioksidanasa. ABTS^{•+} se dobija reakcijom svežeg rastvora 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), sa kalijum-persulfatom, K₂S₂O₈. Aktivnost se određuje spektrofotometrijski, merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 734 nm (Re i saradnici, 1999).

CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) je osetljiva metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti. Odeđivanje antioksidativne aktivnosti CUPRAC metodom se izvodi na pH vrednosti bliskoj fiziološkoj pH što je uz stabilnost reagensa na prisustvo kiseonika iz vazduha, sunčeve svetlost i vlažnosti glavna prednost u odnosu na druge metode. CUPRAC metoda se zasniva na praćenju redukcije bakar (II) jona koji sa neokuproinom (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), pri pH=7 gradi bezbojan bis(neokuproin)bakar(II) helatni kompleks,

TEORIJSKE OSNOVE

Cu(II)-Nc po kome metoda nosi naziv. Od Cu(II)-Nc u prisustvu redukcionog sredstva nastaje Cu(I)-Nc, kompleksno jedinjenje narandžasto-crvene boje koje pokazuje maksimum apsorpcije na 450 nm (Apak i sardnici, 2008).

Merenje ukupne redukcionog moći (TRP-Total Reducing Power) zasniva se na reakciji redukcije $K_3[Fe(CN)_6]$ kompleksa koji je narandžasto obojen u plavo obojeni kompleks $KFe[Fe(CN)_6]$ poznatiji kao "Berlinsko" ili "prusko plavo", koji apsorbuje na 700 nm (Oyaizu, 1986).

2.5. Antimikrobna aktivnost ekstrakata ispitivanih lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita

Lišajevi proizvode sekundarne metabolite koji poseduju antimikrobna svojstva (Molnar i Farkas, 2010). Acetonski ekstrakt *E. prunastri* (Kosanić i saradnici, 2013) i metanolni ekstrakt *U. cylindrica* (Manojlović i saradnici, 2011; Bacukoglu i saradnici, 2013) poseduje značajnu antimikrobnu aktivnost.

Evernična kiselina izolovana iz lišaja *E. prunastri* (Kosanić i saradnici, 2013), 3-hidroksifizodična kiselina izolovana iz ekstrakta *H. tubulosa* (Yılmaz i saradnici, 2005) i giroforna kiselina izolovana iz više vrsta roda *Umbilicaria* (Candan i saradnici, 2006; Buçukoglu i saradnici, 2013) ispoljavaju jaku antimikrobnu aktivnost.

U ovom istraživanju ispitivano je delovanje acetonskih ekstrakata lišajeva na sledeće mikroorganizme *Staphylococcus aureus*, *Salmonella abony*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis*.

Staphylococcus aureus je bakterija loptastog oblika koja se po Gramu boji pozitivno. Nema izraslina pa je nepokretna. Neki sojevi imaju kapsulu i virulentniji su od sojeva bez kapsule. Raste na većini hranljivih podloga pri čemu formira okrugle, neprozirne, sjajne i glatke kolonije. Nakon inkubacije od 24 h u tečnim podlogama stvaraju zamućenje i talog, a kolonije mogu biti pigmentisane zlatno žute boje. Stafilokoke su generalno veoma otporne bakterije i prema toploti i sušenju, a veoma brzo razvijaju rezistenciju prema antibioticima (Karaklašević, 1987).

Salmonella abony su sitne loptaste bakterije raspoređene u kraće ili duže lance. Svrstavaju se u grupu piogenih koka. Po Gramu se boje pozitivno. Nisu pokretne a neke vrste poseduju kapsulu. Streptokoke za rast traže podloge obogaćene belančevinama. Rastu dobro i na krvnom agaru.

Esherichia coli je aerobna i fakultativno anaerobna bakterija. Pripada Gram-negativnim bakterijama. Štapićastog je oblika, a neki sojevi mogu da imaju tanku kapsulu. Većina

TEORIJSKE OSNOVE

sojeva ima fimbrije i pokretna je. Uspevaju dobro na svim jednostavnim podlogama. Kolonije su okrugle, glatke sjajne, bezbojne i prozirne. Većina sojeva brzo razvija rezistenciju- otporne su na niske temperature, a temperatura od 60°C ih uništava nakon 15 minuta.

Pseudomonas aeruginosa pripada aerobnim i uslovno anaerobnim bakterijama. Po Gramu se boji negativno. Po obliku, to su štapičaste bakterije koje poseduju fimbrije i pokretne su. Nemaju kapsulu i ne proizvode spore. Dobro uspevaju na hranljivom agaru pri čemu formiraju nepravilno okrugle, razlivene kolonije sivkaste boje, mutne i sjajne. Otporne su prema spoljašnjim faktorima i slabim dezinficijensima (Karakašević, 1987).

Bacillus subtilis je Gram-pozitivna sporogena i nepokretna štapičasta bakterija. Obrazuje mutne, suve i nepravilne kolonije. Dobro uspeva na običnim podlogama u aerobnim uslovima. Spada u grupu uslovno patogenih ili oportunih mikroorganizama. Rezistentan je na većinu antibiotika (Sokolovski, 1987).

2.6. Genotoksična aktivnost ekstrakata lišajeva i njihovih sekundarnih metabolita

Genetička toksikologija (genotoksikologija) ima za cilj da detektuje agense iz čovekove okoline koji imaju mogućnost izazivanja genetičkih promena u humanim germinativnim i/ili somatskim ćelijama i da objasni mehanizme nastanka mutacija (mutageneze). Zato je osnovni cilj metoda koje se koriste u genotoksikologiji otkrivanje genetičkih promena, ili nagoveštaja DNK oštećenja. Visok stepen povezanosti između mutagenih i kancerogenih hemijskih agenasa predstavlja dodatnu dimenziju u sagledavanju značaja genotoksičnih ispitivanja i validnosti dobijenih rezultata. Vrste genetskih oštećenja mogu se podeliti u 3 kategorije: genetske mutacije (mutageni agensi), hromozomske aberacije (strukturne promene hromatinskog materijala, klastogeni agensi), aneuploidija i poliploidija (uzrokovane aneugenijskim supstancama) i promene na nivou DNK molekula.

Prethodna istraživanja genotoksične aktivnosti lišajeva *Ramalina farinacea* i *Cladonia foliacea* su pokazala da usninska kiselina, koja predstavlja glavnu komponentu ispitivanih vrsta, ne pokazuje genotoksičnu aktivnost (Koparal i saradnici, 2006). Takođe, metanolni, acetonski, etarski i n-heksanski ekstrakti lišaja *Pseudovernia furfuracea* nisu pokazali genotoksičnu aktivnost (Türkez i saradnici, 2010). S druge strane, Stojanović i saradnici (2013) su utvrdili značajnu antiklastogenu aktivnost depsidona fizodalične, fizodične i 3-hidroksifizodične kiseline izolovanih iz vrste *H. physodes* kao i slabiju aktivnost etarskog, acetonskog i metanolnog ekstrakta lišaja *H. physodes*.

Jedan od testova za detekciju hromozomskih aberacija (oštećenja), je i mikronukleusni test. Test se koristi kao brza proba za klastogene agense (agense koji izazivaju pojavu prekida

TEORIJSKE OSNOVE

na hromozomima) i aneugene agense (hemijske supstance sposobne da izazovu poremećaje na nivou ćelijske deobe) (Heddle, 1973). Mikronukleusi su jasno definisana ekstrajedarna telašca u ćelijskoj citoplazmi okružena membranom, manjih su dimenzija od glavnog jedra i bez vidljive veze sa njim. Njihova pojava je posledica nastanka acentričnih fragmenata usled prekida hromozoma, odnosno poremećaja funkcije deobnog vretena, kada hromozomi ne migriraju ka polovima u toku anafaze i ne ugrađuju se u jedra ćelija u deobi. Posle telofaze ovi fragmenti se ne uključuju u jedra kćerki-ćelija, već formiraju pojedinačne ili višestruke mikronukleuse u citoplazmi. Tako da je ovaj test podjednako osetljiv za otkrivanje oštećenja deobnog vretena i aberacija hromozoma (Volders i saradnici, 1997), pa se prisutnost mikronukleusa smatra kvantitativnim pokazateljem strukturnih i/ili numeričkih aberacija hromozoma, nastalih pod dejstvom genotoksičnih agenasa.

Posmatranje i beleženje mikronukleusa se vrši u binuklearnim ćelijama. Binuklearne ćelije se karakterišu prisustvom dva jedra nakon prve ćelijske deobe, što se postiže dodavanjem citohalazina B koji sprečava deobu citoplazme (blokira se citokineza), ali se ne remete biohemijski procesi u samoj ćeliji, što omogućava neometanu deobu jedra. Na taj način nastaju binuklearni limfoblasti sa udvojenim ali razdvojenim jedrima obavijeni jednom plazma membranom, pa se mikronukleusi mogu jednostavno brojati unutar binuklearnih ćelija (Fenech i Morley, 1993). Sigurnost citohalazin-B mikronukleusnog testa zasniva se na činjenici da se iz jednog uzorka može analizirati više desetina hiljada binuklearnih limfoblasta, što daje objektivnu sliku učestalosti i distribucije hromozomskih aberacija (Fenech, 2000). Osnovna prednost citohalazin-B mikronukleusnog testa je pouzdana identifikacija ćelija koje su prošle samo jednu deobu.

2.7. Uticaj na aktivnost holinesteraze

Ekstrakti lišajeva i izolovani sekundarni metaboliti su korišćenji u mnogim ispitivanjima uticaja na aktivnost različitih enzima (Naemati i saradnici, 1997; Proksa i saradnici 1994). Dokazano je da su atranorin i evernična kiselina inhibitori arginaze (Legaz i Vicente 1983; Legaz i saradnici, 2001; Planelles i Legaz, 1987) dok su divarinol i derivati difenilmetana inhibitori tirozinaze (Matsubara i saradnici, 1997).

Acetilholinesteraza (sistematsko ime acetilholin-acetil-hidrolaza) katalizuje reakciju hidrolize acetilholina do holina i acetata. Ovaj enzim spada u grupu serumskih proteaza koje katalizuju hidrolizu neurotransmitera acetilholina koji se nalazi u sinapsama u mozgu i vrši neurotransmisiju.

TEORIJSKE OSNOVE

Razlikuju se dva tipa holinesteraze: acetilholinesteraza ili holinesteraza I i butirilholinesteraza (acilholin-acilhidrolaza) poznata i kao pseudoholinesteraza ili holinesteraza II. Holinesteraza I je prisutna u eritrocitima, srcu, plućima, sivoj masi mozga i vrši hidrolizu isključivo holinestra, acetilholina ili acetil- β -metilholina. Butirilholinesteraza je prisutna u serumu, jetri, pankreasu, srcu, beloj masi mozga katalizuje hidrolizu alkil i aril-estara holina (acetilholina, butirilholina i benzoilholina) i ima klinički značaj.

Kod obolelih od neurodegenerativnih oboljenja mozga (Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest) pronadjeno je sniženje neurotransmitera pre svega acetilholina. Inhibicija acetilholinesteraze dovodi do akumulacije acetilholina i pomaže u sprečavanju napredovanja bolesti. Postoje ireverzibilni inhibitori holinesteraze (nervni bojni otrovi kao što su sarin i soman) i reverzibilni inhibitori (karbamati, kao što je fizostigmin koji se koristi u lečenju glaukoma). Reverzibilni inhibitori se vezuju za anjonsko mesto na receptoru (usporavajući hidrolizu u minutima), a ireverzibilni inhibitori se vezuju za estrasko mesto na receptoru (usporavaju hidrolizu danima). U lečenju neurodegenerativnih bolesti koriste se reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze. Trenutno dostupni komercijalni inhibitori imaju mnoštvo neželjenih efekata zbog čega se teži ka pronalaženju prirodnih jedinjenja sa manje neželjenih dejstva.

2.8. Ostale biološke aktivnosti lišajeva

U Tabeli 3. navedene su biološke aktivnosti ekstrakata lišajeva i njihovih konstituenata. Metanolni ekstrakti lišajeva *U. crustulosa* i *U. cylindrica* su pokazali citotoksičnu aktivnost prema ćelijama humanog melanoma i karcinoma kolona. Najveću citotoksičnu aktivnost je ispoljila izolovana fizodična kiselina (Kosanić i saradnici, 2013).

Tabela 3. Aktivnosti ekstrakata i izolovanih komponenti ispitivanih vrsta lišajeva

Ekstrakt, komponenta	Aktivnost	Referenca
<i>U. cylindrica</i> metanolni ekstrakt	antioksidativna aktivnost, citotoksična aktivnost, antimikrobna aktivnost	Buçukoglu i saradnici, 2013 Kosanić i saradnici, 2013 Manojlovic i saradnici, 2012
<i>U. cylindrica</i> hloroformski ekstrakti	antioksidativna aktivnost	Manojlovic i saradnici, 2012
<i>U. crustulosa</i> acetonski ekstrakt	antioksidativna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2012

TEORIJSKE OSNOVE

<i>U. crustulosa</i> metanolni ekstrakt	citotoksična aktivnost	Kosanić i saradnici, 2013
<i>E. prunastri</i> acetonski ekstrakt	antioksidativna aktivnost, antibakterijska aktivnost	Mitrović i saradnici, 2011 Kosanic i saradnici, 2013
<i>E. prunastri</i> metanolni ekstrakt	antioksidativna aktivnost	Kosanic i saradnici, 2013 Mitrović i saradnici, 2011
<i>H. tubulosa</i> acetonski, etarski ekstrakt	antibakterijska aktivnost	Yılmaz i saradnici, 2005
metil-orselinat	antibakterijska aktivnost	Fujikawa i saradnici, 1970
lekanorna kiselina	antioksidativna aktivnost	Buçukoglu i saradnici, 2013
umbilikarična kiselina	antioksidativna aktivnost,	Buçukoglu i saradnici, 2013
giroforna kiselina	antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost, fotoprotektivna aktivnost	Candan i saradnici, 2006 Buçukoglu i saradnici, 2013 Fernandez i saradnici, 1998
fizodična kiselina	antioksidativna aktivnost, citotoksična aktivnost	Stojanović i saradnici, 2010 Mitrović i saradnici, 2011 Kosanić i saradnici, 2013
3-hidroksifizodična kiselina	antimikrobna aktivnost	Kosanić i saradnici, 2012 Yılmaz i saradnici, 2005
evernična kiselina	antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost, inhibicija enzima	Kosanić i saradnici, 2012 Mitrović i saradnici, 2011 Planelles i Legaz, 1987
atranorin	antimikrobna aktivnost, antioksidativna aktivnost, fotoprotektivna aktivnost	Molnar i saradnici, 2010 Hidalgo i saradnici, 1994 Fernandez i saradnici, 1998
usninska kiselina	antimikrobna aktivnost, fotoprotektivna aktivnost, antivirusna aktivnost	Molnar i saradnici, 2010 Fernandez i saradnici, 1998 Yamamoto i saradnici, 1995
hloratranorin	antimikrobna aktivnost, dermatosenzitivna	Turk i saradnici, 2006

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparati

- Analiza fenolnih komponenti izvršena je na aparatu HPLC system 1200 series, Agilent Technologies (SAD) sa DAD detektorom.
- Određivanje isparljivih komponenti analiziranih ekstrakata izvršeno je 7890/7000B GC - MS/MS uređajem, sa triplkvadropolom (QqQ), proizvođača Agilent Technologies (SAD) koji je opremljen Combi PAL uzorkivačem (autosemplerom).
- ^1H i ^{13}C jednodimenzionalni i dvodimenzionalni NMR spektri su snimani na Bruker Avance III 400 MHz NMR spectrometru
- Sadržaj metala u uzorcima lišajeva određivan je na Induktivno Kuplovanom Atomskom Emisionom Spektrometru (ICP-OES, Inductively Coupled Atomic Emission Spectrometer, Thermo Scientific, iCAP 6000, Velika Britanija).
- Antioksidativna aktivnost određivana je spektrofotometrijskim metodama korišćenjem UV-VIS spektrofotometra (Perkin-Elmer Lambda 15).
- Određivanje inhibicije humane holinesteraze izvršeno je spektrofotometrijski na Konelab 20 analizatoru (ThermoFisher Scientific, Helsinki, Finska).
- U pripremi ekstrakata korišćeno je ultrazvučno kupatilo (Maget, Bela Palanka).
- Voda visokog stepena čistoće (provodljivost $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$) je dobijena korišćenjem MicroMed sistema (Thermo Electron LED GmbH, Nemačka).

3.2. Reagensi i rastvori

U radu su korišćeni sledeći reagensi i rastvori:

- Aceton HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka)
- Etar HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka)
- Etil-acetat HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka)
- Dihlormetan HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Nemačka)
- 1%-tni rastvor $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck, Nemačka)
- 10%-tna trihlorsirćetna kiselina (Merck, Nemačka)
- 0,1% -tni rastvor FeCl_3 (Merck, Nemačka)
- Na_2CO_3 (Merck, Nemačka)
- Askorbinska kiselina (vitamin C) (Sehrlau, Nemačka)
- Galna kiselina (Mallinckrodt, Nemačka)

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

- Pufer $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=6,6$) (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 Zorka, Srbija)
- $0,01 \text{ M}$ rastvor CuCl_2 (Merck, Nemačka)
- Pufer NH_4OAc ($\text{pH}=7$) (Merck, Nemačka)
- Butilhidroksitoluen (BHT) (Zorka, Srbija)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (La Chema, Nemačka)
- Kalijum-persulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Merck, Nemačka)
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) (Sigma Aldrich, Nemačka)
- metanol (100%, VWR International S.A.S, Francuska)
- 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS)(Sigma Aldrich, Nemačka)
- 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin) (Merck, Nemačka)
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma Aldrich, Nemačka)
- Mueller Hintonov agar hranljiva podloga (Difco Laboratories, Detroit, MI USA)
- Sterilni mikrodiskovi prečnika 12 mm ("Antibiotica Test Blattchen", Schleicher and Schuell, Dassel, Nemačka)
- Glacijalna sirćetna kiselina (Zorka, Srbija)
- mitomicin C (MMC), Bristol-Myers Squibb, SAD
- Amifostin WR-2721 (98%, S-2[3-aminopropilamino-1-etilfos-fotioična kiselina, Marligen-Biosciences, SAD))
- RPMI 1640 hranji medijum (RPMI 1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES; Invitrogen-Gibco-BRL, Beč, Austrija)
- Citohalazin B (Invitrogen-Gibco-BRL, SAD)
- 0,9%-tni rastvor NaCl (Merck, Sharp and Dohme GMBH., Beč, Austrija),
- 2%-tni rastvor Gimza boje (Sigma Aldrich, Nemačka).
- Butirilthiolin-jodid (BuTC) (Sigma Co. St. Louis, Missouri, SAD)
- DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat)) (Sigma Co. St. Louis, Missouri, SAD)
- Neostigmin-bromid (Sigma Co. St. Louis, Missouri, SAD).
- Standardi korišćeni za kalibracione prave kod ICP-OES metoda su:
 - Multielementni standardni rastvor IV za ICP, TraceCERT, Fluka Analytical (Al, As, Ba, Be, B, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Se, Tl, V, Zn)
 - Multielementni standardni rastvor III za ICP, TraceCERT, Fluka Analytical (Ca, K, Mg, Na)
 - Standard Si, TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska

EKSPERIMENTALNI DEO

➤ Standard P, TraceCERT, Fluka Analytical, Švajcarska

3.3. Lišajevski materijal

Lišajevi *U. crustulosa* i *U. cylindrica*. sakupljeni u maju 2015. godine, na Staroj planini, vrh Babin zub (1650 m nadmorske visine, koordinate 43° 23' N, 22° 40' E) sa silikatne stene. Lišaj *H. tubulosa* je sakupljen u maju 2012. godine na planini Seličevica (354 m nadmorske visine, koordinate 43° 14' N, 21° 58' E) sa kore domaće šljive *Prunus domestica*. Lišaj *E. prunastri* je sakupljen u oktobru 2015. godine na Vlasinskoj visoravni (1213 m nadmorske visine, koordinate 42°41' N i 22° 20' E u Srbiji) sa kore domaće šljive *P. domestica*. Lišajevski materijal je odvojen od domaćina i sušen na vazduhu u toku 10 dana bez izlaganja sunčevoj svetlosti ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) i skladišten na tamnom mestu, na sobnoj temperaturi u papirnatim kesama.

Vaučeri su deponovani u Herbarijumu na departmanu za Biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu pod vaučerskim brojem datim u Tabeli 4.

Tabela 4. Podaci o lišajevima: lokacija uzorkovanja, vaučer broj i prinos acetonskih ekstrakata (srednja vrednost \pm SD)

Vrsta	Lokalitet	Broj vaučera	Prinos ekstrakta %
<i>U. crustulosa</i>	Babin zub	9375	7,4 \pm 0,5
<i>U. cylindrica</i>	Babin zub	9373	5,4 \pm 0,4
<i>H. tubulosa</i>	Seličevica	10355	9,7 \pm 0,4
<i>E. prunastri</i>	Vlasinska visoravan	10892	6,6 \pm 0,5

Identifikaciju uzoraka je izvršio dr Bojan Zlatković, vanredni profesor Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-Matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

3.4. Priprema ekstrakata

Ekstrakti su pripremljeni na sledeći način: po 2 g fino sprasjenih talusa lišajeva su kvantitativno preneti u tamne boce i preliveeni sa 10 mL odgovarajućeg rastvarača (acetone, etar, etil-acetat, dihlorometan), a zatim ekstrahovani korišćenjem ultrazvuka u toku 30 min. Nakon toga ekstrakti su ostavljeni u mraku na sobnoj temperaturi u toku 24 h. Ekstrakti su filtrirani kroz mikrofilter 0,45 μm u vijale za HPLC i GC-MS analizu.

U cilju određivanja biološke aktivnosti 10 g suvog lišaja je ekstrahovano sa 50 mL acetona (u odnosu 1:5) u toku 30 min u ultrazvučnom kupatilu. Ekstrakti su ostavljeni u mraku u toku 5 dana na sobnoj temperaturi i filtrirani kroz filter papir (bela traka) na kvali

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

levku. Ostatak je ispiran malom zapreminom rastvarača. Suvi ekstrakt je dobijen otparavanjem acetona na rotacionom vakuum uparivaču sa vodenim kupatilom na temperaturi od 40°C. Ekstrakti su pripremani u triplikatu, a prinosi su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Prinosi acetonskih ekstrakata lišajeva dati su u Tabeli 3.

3.5. HPLC analiza

HPLC analiza je izvršena na tečnom hromatografu sa DAD detektorom opremljenim kvaternarnom pumpom, degazatorom, autosamplerom, termostatiranom kolonom i softverom Chemstation (Agilent Technologies). Razdvajanje je ostvareno pomoću Zorbax XDB C18 kolone (5 μ m, 150 mm x 4,6 mm) termostatirane na 25°C. Eluiranje je izvršeno izokratski sistemom metanol:dejonizovana voda:mravlja kiselina u odnosu 80:20:0,2 pri čemu je protok mobilne faze iznosio 0,5 mL min⁻¹. Injektovana zapremina uzorka je iznosila 5 μ L (koncentracija 10 mg mL⁻¹ rastvarača). Spektri su snimani u opsegu talasnih dužina od 190 do 400 nm, a detekcija je vršena na 254 nm. Identifikacija je izvršena na osnovu retencionih vremena i UV spektara dostupnih standarda i izolovanih komponenti u prethodnim eksperimentima snimanih pod istim uslovima.

Preparativna HPLC analiza je izvršena na istom aparatu sa semi-preparativnom kolonom, Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 250 x 9,4 mm). Eluiranje je izvršeno istom mobilnom fazom pri protoku od 2,5 mL min⁻¹. Zapremina injektovanog uzorka je iznosila 30 μ L (koncentracija 100 mg mL⁻¹ metanola).

3.6. GC-MS analiza

Određivanje isparljivih komponenti acetonskog, etarskog, etil-acetatnog i dihlormetanskog ekstrakta izvršeno je GC-MS metodom. Pre injektovanja svaki uzorak je filtriran kroz mikrofilter (0,45 mm PTFE). Svi uzorci su snimani u triplikatu korišćenjem 7890 GC hromatografa opremljenim Combi PAL autosamplerom i HP-5 MS kolonom (5% fenilmetilsiloksan, 30m x 0,25mm, debljina filma 0,25 μ m) kuplovanim sa 7000B (MS/MS) masenim detektorom iste kompanije sa tripl kvadrupol sistemom u MS1 sken modu. Temperaturni program započinje od 70°C u toku prvih 2,25 min, praćen linearnim porastom temperature (gradijent 5°C min⁻¹) do 300°C a zatim se temperatura izotermiski održava na 300°C zadnjih 10 minuta programa. Temperatura injektora je 250°C a interfejsa 300°C. Protok nosećeg gasa-helijuma bio je 1 mL min⁻¹, injektovana zapremina uzorka iznosila je 5 μ L a odnos splita iznosio je 2:1. Bekfleš u trajanju od 1,89 min na 280°C, sa pritiskom helijuma od 50 psi (3,4 bar). Uslovi za MS su: jonizacioni napon 70 eV, opseg masa 50-650

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

amu, vreme skenova 0,32 s. GC-FID analiza je uzvedena pod istim eksperimentalnim uslovima kao GC-MS analiza a procentni sastav je preračunat na osnovu površine GC-FID pikova, bez korekcionih faktora.

Komponente lišajeva su određene pomoću AMDIS softvera korišćenjem linearnih retencionih indeksa (RI) izračunatih na osnovu retencionih vremena standardne serije n-alkana (C₈-C₄₀), snimljene na istom aparatu i pod istim uslovima kao i uzorci. Identifikacija je izvršena upoređivanjem masenih spektara komponenti lišajeva sa literaturnim masenim spektrima Wiley 6, NIST02, MassFinder (Stein, 1990) i upoređivanjem dobijenih RI sa podacima iz dostupnih biblioteka (Stein 1990, Adams, 2007; NIST Chemistry WebBook). U Prilogu su dati TIC hromatogrami ispitivanih ekstrakata, podaci o fragmentaciji i maseni spektri pojedinih komponenti lišajeva.

3.7. NMR analiza

NMR spektri su snimani na 25°C sa tetrametilsilanom (TMS) kao unutrašnjim standardom. Kao rastvarači korišćeni su: deuterisani hloroform (CDCl₃) za metil-orselinat (3), i deuterisani dimetilsulfoksid (DMSO-d₆) za lekanornu kiselinu (6), metil-lekanorat (17), i girofornu kiselinu (11). Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm jedinicama u odnosu na referentni TMS ($\delta_{\text{H}}=0,00$ ppm) za ¹H spektre ili u odnosu na CDCl₃ ($\delta_{\text{H}}=7,26$ ppm i $\delta_{\text{C}}=77,16$ ppm) ili DMSO-d₆ ($\delta_{\text{H}}=2,50$ ppm i $\delta_{\text{C}}=39,52$ ppm) za ¹³C NMR i heteronuklearne NMR spektre. Skalarna sprežanja (konstante kuplovanja, J) su izražene u Hz. Za snimanje je rastvoreno 10 mg komponente u 1 mL deuterisanog rastvarača i 0,7 mL tog rastvora je prebačeno u NMR cevčice (5mm, Wilmad, 528-TR-7).

¹H i ¹³C jednodimenzionalni i dvodimenzionalni NMR spektri su snimani na Bruker Avance III 400 MHz NMR spectrometru (¹H na 400 MHz, ¹³C na 101 MHz). 2D NMR spektri (¹H-¹H COSY, NOESY, HSQC, HMBC) DEPT 90/135 su snimani u uobičajenoj pulsnoj sekvenci. Podaci su obrađeni u programu MastReNova.

3.8. Određivanje specifične aktivnosti ⁴⁰K, ¹³⁷Cs, ²²⁶Ra i ²³²Th

Homogenizovani uzorak lišaja je osušen u sušnici na 105°C do konstantne mase, prebačen u plastične Marinelli bakers-sudove, zatvoren i ostavljen 4 nedelje do postizanja radioaktivne ravnoteže (HASL-300, 1983). Pripremljeni uzorak je smešten u HPG detektor i meren 86 000 s. Pozadinsko gama zračenje je određeno pre merenja uzorka merenjem praznog Marinelli suda pod istim uslovima. Vreme merenja pozadinskog zračenja-šuma

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

iznosilo je 240 000 s. Pozadinsko zračenje predstavlja prirodni nivo zračenja i oduzima se iz gama spektra uzorka.

Merenje aktivnosti uzorka se sprovodi korišćenjem koaksijalnog semikonduktorskog detektora visoke rezolucije sa germanijumskim kristalom visoke čistoće (HPGe ORTEC GEM 50) sa relativnom efikasnošću od 50% na 1332 keV. Detektor je zaštićen olovom kako bi se postigao što niži nivo prirodnog fona. Energetska kalibracija i kalibracija efikasnosti je sprovedena pre merenja. Kalibracioni izvor je komercijalno dostupni gama standard sa smešom radionukliida-tip MBSS 2 u Marinelli sudu zapremine 0,5 L (razvijenim od strane Inspektorata za Jonizujuće Zračenje, Češki Metereološki Institut) sa izotopima ^{241}Am , ^{109}Cd , ^{57}Co , ^{139}Ce , ^{113}Sn , ^{85}Sr , ^{137}Cs , ^{88}Y , ^{203}Hg , i ^{60}Co . Energija gama linija ovih radionukliida je adekvatna za kalibraciju i pokriva oblast od interesa (od 30 do 3000 keV). Korekcija zbog radioaktivnog raspada, oduzimanje prirodnog fona zračenja, kao i analiza rezultata je sprovedena korišćenjem softvera ORTEC Gamma Vision-32 Model A66-B32 Verzija 6,01.

Aktivnost ^{226}Ra je određena na osnovu njegovog potomka radioaktivnog raspada: ^{214}Pb (295,22 keV, 351,93 keV) i ^{214}Bi (609,31 keV, 1120,29 keV). U slučaju ^{232}Th korišćena su dva fotopika ^{228}Ac (911,20 i 698,97keV). Aktivnosti ^{40}K i ^{137}Cs su dobijene iz gama linija na 1460,83 keV i 661,66 keV, redom.

3.9. ICP-OES analiza

Sadržaj 19 elemenata (Ca, K, Mg, Na, P, Al, B, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Mn, Si, V, Zn, Ba, Cd, Pb) u ispitivanim vrstama lišajeva je određen optičkom emisionom spektrometrijom sa induktivno kuplovanom plazmom.

Za mineralizaciju uzoraka korišćena je 95% azotna kiselina. Merenje je izvršeno korišćenjem ICP-OES iCAP 6000.

Odmeren je 1g suvog uzorka lišaja, sprasjen u avanu i tretiran sa 30 mL conc. HNO_3 . Uzorci su stajali 24 časa uz povremeno mućkanje, a zatim zagrevani na rešou sve do prestanka izdvajanja para oksida azota pri čemu se dobijaju bistri rastvori. Nakon potpune mineralizacije dobijeni rastvori su filtrirani i dopunjeni dejonizovanom vodom do zapremine od 50 mL (Bargagli, 2000).

Karakteristike ICP spektrometra serije iCAP 6000

Optički sistem čine ešeletna rešetka i sferna ogledala za odličnu optičku rezoluciju. Sistem je konstantno u atmosferi argona ili azota. Opseg talasne dužine je od 166,250 nm (što omogućava određivanje Al na 167,120 nm, a to je i njegova najosetljivija linija) do 847,000

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

nm (što omogućava određivanje K na 766,490 nm i Na na 818,326 nm). Korišćen je CID (charge injection device) detektor sa obezbeđenim hlađenjem kamere na -45°C . Posmatranje plazme je aksijalno za primene koje zahtevaju niži limit detekcije (LOD) ili radijalno u cilju minimiziranja efekta matriksa. Limit detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektovati, ali ne i kvantifikovati.

Induktivno kuplovana plazma obezbeđena je upotrebom RF generatora sa iskorišćenjem snage $>78\%$; frekvencije 27,12 MHz. Za unošenje uzoraka korišćen je stakleni koncentrični nebulajzer i staklena komora za raspršivanje. Brzina pumpe je u opsegu od 0-125 rpm a korišćenje *Stand by mode*-a sprečava oštećenje pumpe nakon gašenja plazme. Plazmeni plamenik čine kvarcne cevi različitog prečnika. Protok gasa za raspršivanje reguliše se ručno u intervalu od 0 do 0,4 MPa. Operativni sistem Microsoft WindowsTM 2000 ili XP Softver uz upotrebu iTEVA operativnog softvera za seriju iCAP 6000 omogućuje kontrolu svih funkcija instrumenta. Sva merenja su izvršena u tri ponavljanja.

Za analizu uzoraka lišajeva izabrani su sledeći parametri instrumenta:

- snaga radiofrekventnog (RF) generatora – 1150 W,
- brzina peristaltičke pumpe – 100 rpm,
- brzina pumpe za analizu - 50 rpm,
- protok gasa za hlađenje – 12 L min^{-1} ,
- protok gasa za raspršivanje – $0,7\text{ L min}^{-1}$,
- pravac posmatranja plazme – aksijalni,
- vreme ispiranja – 30 s,
- broj merenja – 3.

Talasne dužine određivanih elemenata (nm):

Al 396,152; B 249,773; Ba 455,403; Ca 393,366; Cd 214,438; Co 228,616; Cr 357,969; Cu 324,754; Fe 259,940; K 766,490; Mg 279,553; Mn 257,610; Na 589,592; Ni 231,604; P 213,618; Pb 220,353; Si 288,158; V 292,402; Zn 213,856.

3.10. Antioksidativna aktivnost

Određivanje ukupnog sadržaja fenola (TPC)

Zapremina od 50 μL metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta (koncentracije 15 mg mL^{-1}) je pomešana sa 200 μL Folin–Ciocalteu reagensa. Nakon 1 minuta dodato je 2 mL 20% rastvora natrijum-karbonata i dopunjeno je destilovanom vodom do zapremine od 7,55 mL . Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku merena je apsorbancija na 750 nm. Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja vršeno je korišćenjem

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

kalibracione prave galne kiseline. Sve analize su izvedene u triplikatu. Rezultati su izraženi kao μg ekvivalenta galne kiseline po mg suvog ekstrakta ($\mu\text{g GAE mg}^{-1}\text{SE}$).

Određivanje „scavenging“ antioksidativnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalu

U 1,5 mL metanolnog rastvora DPPH• radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) koncentracije 1×10^{-4} mol L^{-1} dodato je 200 μL metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta u koncentraciji od 15 mg mL^{-1} i dopunjeno metanolom do 4 mL. Nakon inkubacije u mraku u trajanju od 30 minuta merena je apsorbanca na talasnoj dužini od 515 nm. Kao slepa proba korišćen je metanol. Sve analize su izvedene u triplikatu. Kapacitet „hvatanja” (scavenging) radikala je određen iz kalibracione prave korišćenjem Troloxa kao pozitivne kontrole i izražen kao μg Trolox ekvivalenta po mg suvog ekstrakta ($\mu\text{g TE mg}^{-1}\text{SE}$). Aktivnost hvatanja radikala je izražena kao procenat inhibicije DPPH radikala i izračunat je sledećom jednačinom:

$$\text{RSC (\%)} = 100 \times (A_0 - A_1 / A_0)$$

A_0 - apsorbanca kontrolnog uzorka,

A_1 - apsorbanca rastvora sa analiziranim ekstraktom

IC_{50} vrednost (koncentracija uzorka koja je neophodna za neutralizaciju 50% DPPH radikala) izračunata je na osnovu nelinearne regresione analize a izražena je u jedinicama $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Određivanje "scavenging" antioksidativnog slobodno radikalskog kapaciteta prema 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat) (ABTS) radikalu

ABTS^{*+} katjon radikal se dobija reakcijom svežeg ABTS rastvora sa kalijum-persulfatom. Smeša se ostavlja da stoji u mraku na sobnoj temperaturi u toku 12 sati. Pre upotrebe rastvor se razblaži dodatkom metanola tako da pri talasnoj dužini od $\lambda=734$ nm vrednost apsorbanacije iznosi $0,700 \pm 0,050$. Ispitivani metanolni rastvor acetonskog ekstrakta zapremine 50 μL koncentracije 15 mg mL^{-1} je pomešan sa 1,8 mL razblaženog ABTS rastvora i dopunjeno metanolom do zapremine od 4 mL. Nakon stajanja rastvora 6 minuta na sobnoj temperaturi, smanjenje apsorbance je mereno na talasnoj dužini od 734 nm. Sve analize su izvedene u triplikatu. Rezultati su izraženi kao μg Trolox ekvivalenta po mg suvog ekstrakta ($\mu\text{g TE mg}^{-1}\text{SE}$).

CUPRAC analiza

U smešu koja sadrži 50 μL metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta, 0,95 mL vode, 1 mL amonijum-acetatnog pufera (pH=7) i 1 mL rastvora neokuproina dodato je 1 mL rastvora

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

CuCl₂ (0,01 M). Dobijena smeša je promešana i ostavljena da stoji 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, merena je apsorbance na talasnoj dužini od 450 nm, pri čemu je slepu probu predstavljala smeša reagensa bez dodatog uzorka. Sve analize su izvedene u triplikatu. Rezultati su izraženi kao µg Trolox ekvivalenta po mg suvog ekstrakta (µg TE mg⁻¹SE).

Odredjivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcionne moći (TRP metoda)

U zapreminu od 1 mL 1% rastvora K₃[Fe(CN)₆], dodato je 10 µL metanolnog rastvora acetonskog ekstrakta (koncentracija 15 mg mL⁻¹), 1 mL fosfatnog pufera (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH=6,6) i 1,69 mL destilovane vode. Nakon stajanja od 30 minuta na 50°C dodati su 1 mL 10% trihlorsirćetne kiseline i 0,6 mL 0,1% rastvora FeCl₃. Određivanje ukupne redukcionne moći izvršeno je merenjem apsorbance rastvora na talasnoj dužini od 700 nm. Ukupna redukcionna moć je određivana korišćenjem askorbinske kiseline kao standarda i rezultati su izraženi kao µg AAE po mg suvog ekstrakta (µg AAE mg⁻¹SE).

3.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti acetonskih ekstrakata

Antimikrobna aktivnost je određivana disk difuzionom metodom. Ispitivana je aktivnost na tri Gram-negativne (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella abony* NCTC 6017) i dve Gram-pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Analiza je sprovedena po propisima Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (NCCLS).

Korišćena je Mueller Hintonov agar hranljiva podloga za Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije pripremljena po instrukcijama proizvođača. Podloge se izlivaju u Petrijeve šolje u zapremini od 20 mL podloge dajući visinu sloja od 4 mm. Sto µL bakterijske suspenzije se dodaje u svaku podlogu (10⁸ ćelija po mililitru). Sterilni mikrodiskovi prečnika 12 mm su impregnisani sa 50 µL rastvora uzorka u acetonu (koncentracije 20 mg mL⁻¹) kako bi se postigla koncentracija od 1 mg po disku. Standardni diskovi streptomicina (10 µg po disku prečnika 6 mm) i hloramfenikola (30 µg po disku prečnika 6 mm) su korišćeni kao pozitivne kontrole. Svaki test je izveden u triplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD.

3.12. Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme

Za analizu je uzeto po 5mL venske krvi od 5 zdravih odraslih osoba muškog pola, odabranih po principu slučajnosti, prosečne starosti 42,3 godina, koji profesionalno nisu izloženi fizičkim ili hemijskim mutagenima. Ispitivani ekstrakti u koncentracijama od $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ su testirani *in vitro* mikronukleusnim testom u kulturama ćelijske suspenzije limfocita periferne krvi čoveka. Zabeležena je frekvencija i distribucija mikronukleusa u humanim limfocitima. Praćeno je i formiranje mikronukleusa usled dejstava agensa za alkilovanje, mitomicina C (MMC) i prevencija formiranja MN usled delovanja agenasa DNK sistema reparacije, amifostina WR-2721. Agens za alkilovanje (MMC) je pripremljen razblaživanjem u fosfatnom puferu (PBS), dodat u konačnoj koncentraciji od $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ u kulturu limfocita i korišćen je kao negativna kontrola pošto povećava broj mikronukleusa izazivajući takozvani klastogeni efekat (Vucković i saradnici, 2010). MMC je u stanju da indukuje aberaciju hromozoma u *in vitro* uslovima (Camelo i saradnici, 2008), DNK oštećenje i formiranje mikronukleusa (Gođevac i saradnici, 2011). S druge strane, amifostin WR-2721 (98 %, S-2[3-aminopropilamino-1-etilfos-fotioična kiselina, Marligen-Biosciences)) fosforilovani cisteaminski derivat korišćen je kao pozitivna kontrola.

Sve kulture su inkubirane u termostatu na 37°C tokom 19 sati. Tretman ekstrakata lišajeva je trajao 19 sati jer je preračunato da je to vreme koje je potrebno da se ekstrakti koji su uneti u organizam metabolišu i izluče (Fenech i saradnici, 1990). Posle toga su sve kulture isprane u čistom medijumu, prenešene u 5 mL svežeg RPMI 1640 hranjivog medijuma (RPMI 1640 Medium + GlutaMAX + 25 mM HEPES; Invitrogen-Gibco-BRL, Vienna, Austria) i nastavljeno je inkubiranje u toku 72 sata.

Aproksimativno 2×10^6 krvnih ćelija se nalazi u 5 mL RPMI 1640 hranjivog medijuma. Nakon 44 sati inkubacije dodaje se citohalazin B (Invitrogen-Gibco-BRL) u konačnoj koncentraciji od $6 \mu\text{g mL}^{-1}$, i inkubiranje se nastavlja još 24 sata. Nakon završenih 72 sata vrši se centrifugiranje (na 1200 rpm), ispiranje ćelija u 0,9% NaCl, ponovo centrifugiranje ćelija (na 1200 rpm) i ispiranje u blago hipotoničnom rastvoru koji se sastojao od 0,56% KCl + 0,9% NaCl, u odnosu 1:1. Suspenzija ćelija se fiksira u rastvoru metanola i sirćetne kiseline u odnosu 3:1. Preparati su osušeni na vazduhu i bojeni 2%-tnim rastvorom Gimza boje (Fenech M, Morley AA, 1993). Za analizu mikronukleusa je prebrojano 1000 binuklearnih ćelija po uzorku, po kriterijumima Countryman i Heddle (1976) i Fenech i Morely (1993).

E K S P E R I M E N T A L N I D E O

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD. Statistička analiza je rađena koristeći Origin software package version 7.0. Statistička značajnost je određena primenom analize varijanse (One-way ANOVA) korišćenjem Tukey post-hoc testa. Smatrane su statistički značajnim razlike za koje je $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

3.13. Ispitivanje uticaja acetonskih ekstrakata na aktivnost serumske holinesteraze

Uticaj ekstrakata i izolovane giroforne kiseline na aktivnost serumske holinesteraze je određen spektrofotometrijski korišćenjem Konelab 20 analizatora sa termostatiranim ćelijama dužine 7 mm, na talasnoj dužini od 405 nm (Stankov Jovanović i saradnici, 2015). Ukratko, 10 μ L analiziranog rastvora (blank, uzorak ili referentni standard) je pomešano sa 10 μ L humanog seruma (razblaženog sa fosfatnim puferom u odnosu 1:9, v/v) i rastvorom fosfatnog pufera (160 μ L). Smeša je stajala 10 min na 37°C nakon čega je dodato 10 μ L rastvora DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat)). Nakon 1 minuta stajanja dodato je 10 μ L rastvora supstrata butiriltioholina (BuTC). Kao referentni standard korišćen je rastvor neostigmin-bromida u koncentraciji od 200 μ g mL⁻¹. Koncentracije rastvora ispitivanih supstanci u dimetil-sulfoksidu bile su 10 mg mL⁻¹. Rezultati su izraženi u procentima inhibicije (negativna vrednost) ili aktivacije (pozitivna vrednost) računatih po formuli:

$$\% \text{ inhibicije/aktivacije} = ((I_x - I_0) / I_0) \times 100$$

Gde je I_0 apsorbancija reakcione smeše bez dodatih uzoraka a I_x je apsorbancija u prisustvu ispitivane supstance.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Hemijski sastav

4.1.1. HPLC analiza acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakta

Sastav acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakta je dat u Tabelama 5 i 6. Odabrani hromatogrami su prikazani na slikama 10-13, a ostali su dati u Prilogu 1. Podaci o molekulskoj masi, UV, ^1H i ^{13}C NMR spektri dati su takođe u Prilogu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 5. Relativna zastupljenost komponenata ekstrakata lišajeva *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *H. tubulosa* i *E. prunastri* (izražena kao procenat ukupne apsorbance merene na 254 nm)

Redni broj	CR (%)				CY (%)				HT (%)				EP (%)			
	A	E	EA	DCM	A	E	EA	DCM	A	E	EA	DCM	A	E	EA	DCM
1	-	-	-	-	2,0	21,8	16,6	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	1,7	42,1	28,7	23,7	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1,5	8,6	9,2	4,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,4	0,1
5	-	-	-	-	2,8	12,7	4,9	11,8	-	-	-	-	-	-	-	-
6	5,7	11,9	16,1	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	2,8	0,8	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	14,8	11,3	15,4	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	8,4	3,9	10,6	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	5,6	4,4	-	-	-	-	-
11	78	74,7	67,7	2,6	83,5	23,5	17,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,3	61,4	29,2	15,4
13	-	-	-	-	-	-	-	-	47,2	31,9	44,3	3,9	-	-	-	-
14	-	-	-	10,1	0,2	-	-	-	-	-	-	-	1,2	1,1	1,0	0,8
15	-	1,3	0,7	58,2	5,0	0,5	26,9	53,3	12,8	6,8	18,1	31,2	52,6	26,3	50,0	64,0
16	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	1,7	4,3	9,6	11,8	5,9	13,9	17,8

U. crustulosa (CR), *U. cylindrica* (CY), *H. tubulosa* (HT) i *E. prunastri* (EP); acetonski (A), etarski (E), etil-acetatni (EA), dihlormetanski (DCM) ekstrakti

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 6. Identifikovane komponente, retenciono vreme, apsorpcioni maksimumi i zastupljenost u ekstraktima ispitivanih vrsta lišajeva

Redni broj	Komponenta	Rt (min)	Apsorpcioni maksimum (nm)	ZASTUPLJENOST			
				CR	CY	HT	EP
1	Salazinska kiselina	3,3	212, 242, 312	-	A,E,EA, DCM	-	-
2	Noristiktik kiselina	3,4	212, 238,310	-	A,E,EA, DCM	-	-
3	Metil-orselinat	4,1	218, 270, 308	A,E,EA, DCM	-	-	-
4	Everninična kiselina	4,0	220, 260, 300	-	-	-	A,EA DCM
5	Metil-β-orselinat	4,8	218, 268, 304	-	A,E,EA, DCM	-	-
6	Lekanorna kiselina	4,9	220, 270, 312	A,E,EA, DCM	-	-	-
7	Krustinska kiselina	5,2	220, 268, 308	A,E, EA	-	-	-
8	3-Hidroksi fizodična kiselina	6,0	215, 282, 312	-	-	A,E, EA	-
9	Fizodalična kiselina	6,7	210, 245, 315	-	-	A,E, EA, DCM	-
10	4-O-metil-fizodična kiselina	7,7	215, 270	-	-	A,E, EA	-
11	Giroforna kiselina	7,9	225,270, 310	A,E,EA, DCM	A,E,EA	-	-
12	Evernična kiselina	8,5	215, 270, 310	-	-	-	A,E, EA, DCM
13	Fizodična kiselina	10,3	232, 262, 318	-	-	A,E, EA, DCM	-
14	Usninska kiselina	19,4	232, 282	DCM	A	-	A,E,EA
15	Atranorin	22,9	215, 260, 330	E,EA, DCM	A,E,EA, DCM	A,E,EA, DCM	A,E,EA, DCM
16	Hloratranorin	29,2	215, 260, 320, 360	-	-	A,E,EA, DCM	A,E,EA, DCM
17	Metil-lekanorat	6,8	228, 270, 308	M	-	-	-

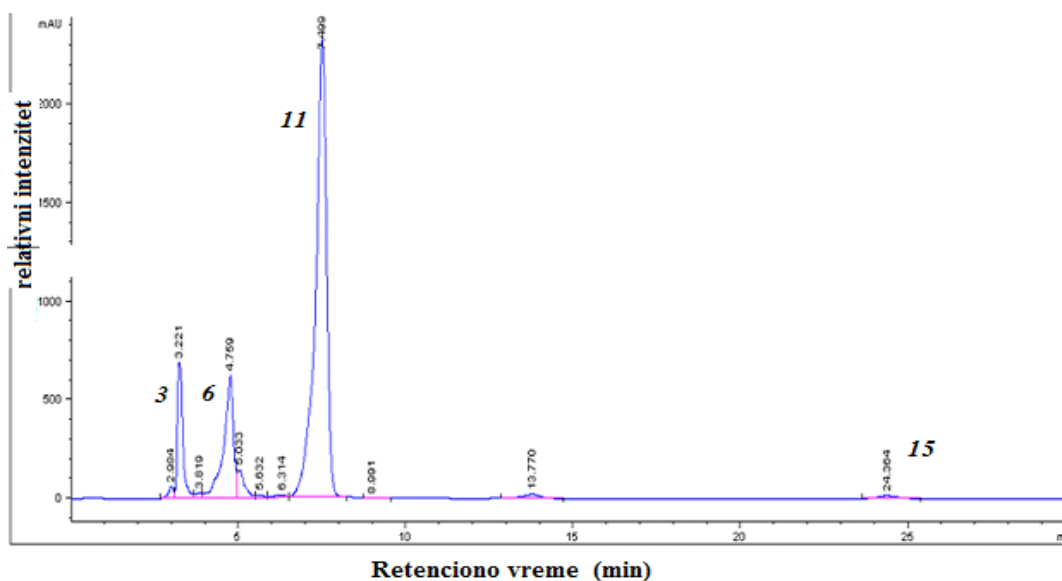
U. crustulosa (CR), *U. cylindrica* (CY), *H. tubulosa* (HT) i *E. prunastri* (EP); acetonski (A), etarski (E), etil-acetatni (EA), dihlormetanski (DCM) i metanolni (M) ekstrakti

REZULTATI I DISKUSIJA

Distribucija supstanci sledi put koji je ranije definisan za frutikozne i foliozne lišajeve gde svaka vrsta sadrži jedan depsid ili depsidon u meduli i usniku kiselinu ili atranorin u korteksu. Analizom acetonskog, etarskog, etil-acetatnog i dihlormetanskog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* utvrđeno je prisustvo monoaromatične komponente metil-orselinata (*methyl-orsellinat*), depsida orcinol tipa lekanorne kiseline (*lecanoric acid*), krustinske kiseline (*crustinic acid*), giroforne kiseline (*gyrophoric acid*) i β -orcinol depsida atranorina (*atranorin*) kao glavnih komponenti. U ispitivanim ekstraktima lišaja *U. cylindrica* detektovane su lišajevske kiseline: salazinska (*salazinic acid*), norstiktik (*norstictic acid*), atrarična (*atraric acid*) i giroforna kiselina kao i depsid atranorin. S druge strane, četiri orcinol depsidona 3-hidroksifizodična kiselina (*3-hydroxyphysodic acid*), fizodalična kiselina (*physodalic acid*), 4-O-metilfizodična kiselina (*4-O-methylphysodic acid*) i fizodična kiselina (*physodic acid*) zajedno sa dva β -orcinol depsida atranorinom i hloratranorinom (*chloroatranorin*) su identifikovani u *H. tubulosa* ekstraktima. Analizom ekstrakata lišaja *E. prunastri* identifikovani su sledeći metaboliti: monoaromatična komponenta everninična kiselina (*evernic acid*), depsidi evernična kiselina (*evernic acid*), atranorin, hloratranorin i dibenzofuransko jedinjenje usninska kiselina (*usnic acid*).

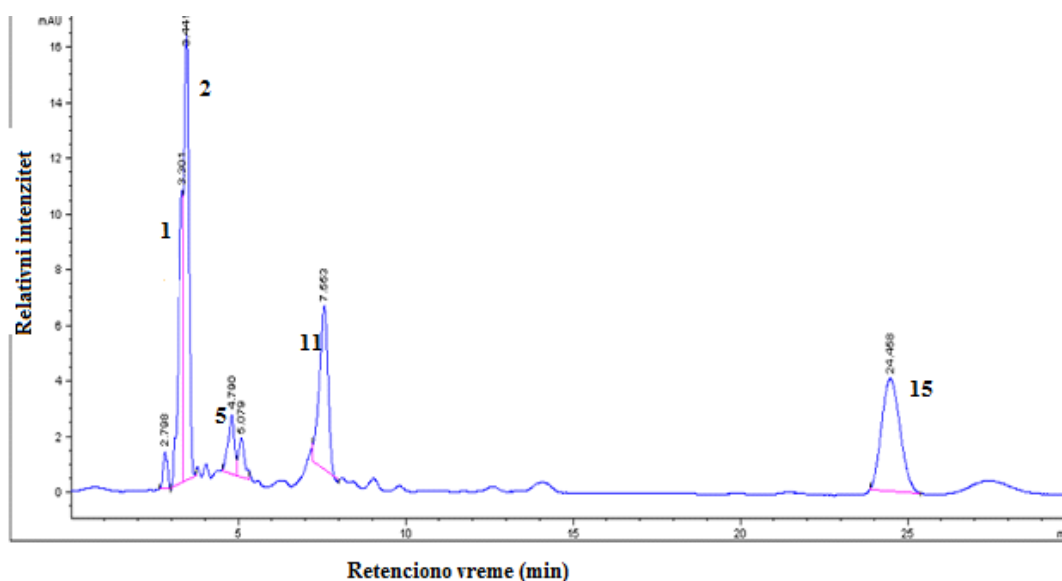
Glavna komponenta acetonskog, etarskog i etil-acetatnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* je tridepsid giroforna kiselina (78%, 67,7% i 74,7%) praćena didepsidom lekanornom kiselinom (5,7; 11,9; 16,1%), tridepsidom krustinskom kiselinom (2,8; 0,8; 2,6%) i monoaromatičnom komponentom metil-orselinatom (1,5; 8,6; 9,2%). Orselinska kiselina i lekanorna kiselina su biohemijski prekursori giroforne kiseline (Posner i saradnici, 1992). Sastav dihlormetanskog ekstrakta je drugačiji i karakteriše se prisustvom β -orcinol depsida atranorina kao glavne komponente (58,2%) i usninske kiseline (10,1%).

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 10. HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* (brojevi pored pikova odgovaraju brojevima jedinjenja iz Tabele 6)

Etarski i etil-acetatni ekstrakti lišaja *U. cylindrica* se uglavnom sastoje od depsidona, norstiktik kiseline (42,1% i 28,7%) kao glavne komponente praćene girofornom kiselinom (23,5% i 17,8%) i salazinskom kiselinom (21,8% i 16,6%). Atrarična kiselina je četvrta komponenta po zastupljenosti (12,7% i 4,9%). S druge strane u acetonskom ekstraktu giroforna kiselina je glavna komponenta (83,5%) dok je zastupljenost nortistikt kiseline, salazinske kiseline i atrarične kiseline veoma niska (1,7%, 2,0% i 2,8%).



Slika 11. HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *U. cylindrica* (brojevi pored pikova odgovaraju brojevima jedinjenja iz Tabele 6)

REZULTATI I DISKUSIJA

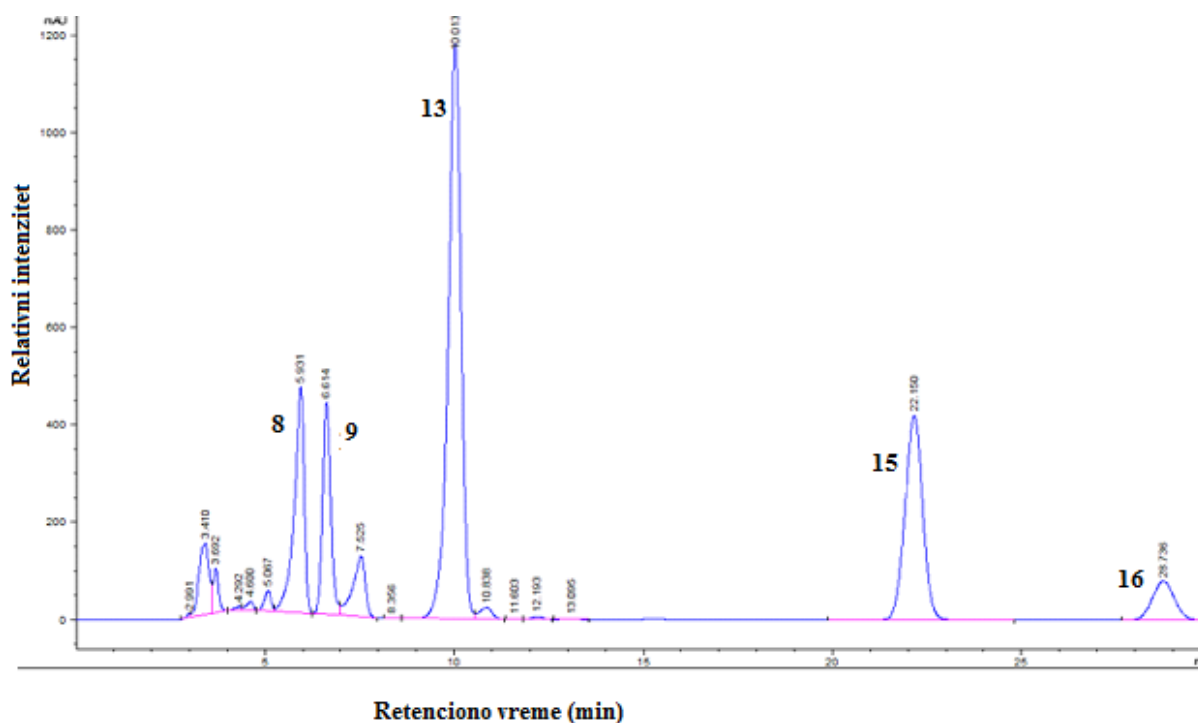
U pogledu glavnih komponenti sastav dihlormetanskog ekstrakta obe vrste je značajno različit u odnosu na ostale ekstrakte. Atranorin je glavna komponenta dihlormetanskog ekstrakta (*U. crustulosa* 58,1% i *U. cylindrica* 53,2%). Usninska kiselina je druga komponenta po zastupljenosti kod *U. crustulosa* ekstrakta (10,1%) pri čemu nije detektovana u etarskim i etil-acetatnim ekstraktima dok je kod *U. cylindrica* ekstrakta druga komponenta noristiktik kiselina (23,7%). Rezultati pokazuju da *U. cylindrica* proizvodi manje lišajevskih supstanci nego *U. crustulosa* što je genetski uslovljeno imajući u vidu da su uzorci sakupljeni na istoj lokaciji u isto vreme.

U pogledu glavnih komponenti rezultati HPLC analize za *U. crustulosa* i *U. cylindrica* su u skladu sa prethodno objavljenim (Posner i saradnici, 1992). Jedan od hemotipova predstavljen u literaturi sadržao je giroformnu kiselinu kao glavnu komponentu lišaja *U. crustulosa* i nortistik kiselinu kao glavnu komponentu lišaja *U. cylindrica*. Rezultati analize su pokazali da analizirani uzorak *U. crustulosa* pripada giroformnom hemotipu.

U dostupnoj literaturi (Sci finder, Google Scholar) nije bilo moguće naći podatke da je giroforna kiselina detektovana u *U. cylindrica* ekstraktu dok je u našem uzorku detektovana u značajnom procentu i to u acetonskom (83,5%), etarskom (23,5%) i etil-acetatnom (26,9%) ekstraktu. S druge strane Manojlović i saradnici (2012), su identifikovali etil-hematomat koji nije detektovan u uzorcima ispitivanim u ovom doktoratu.

Najzastupljeniji konstitutent acetonskog, etarskog i etil-acetatnog ekstrakta *H. tubulosa* je fizodična kiselina praćena 3-hidroksifizodičnom kiselinom i atranorinom. Dihlormetanski ekstrakt se razlikuje od ostalih po visokom sadržaju atranorina, hloratranorina i fizodalične kiseline.

REZULTATI I DISKUSIJA



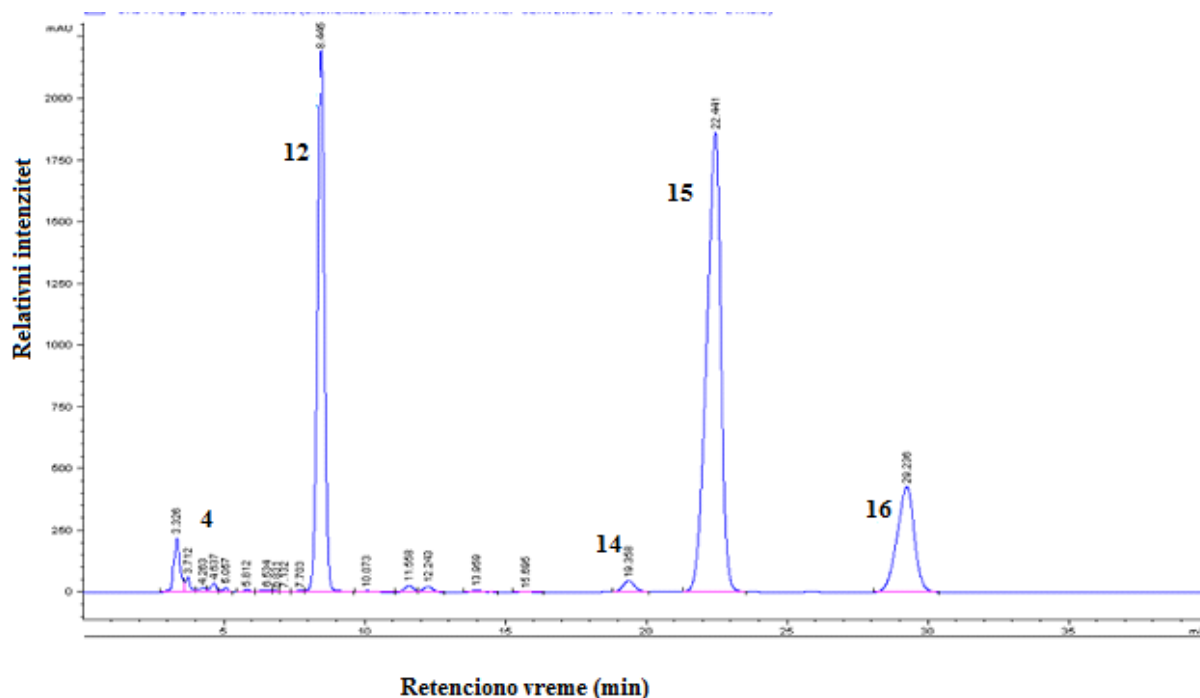
Slika 12. HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta *H. tubulosa* (brojevi pored pikova odgovaraju brojevima jedinjenja iz Tabele 6)

Hemijski sastav lišaja *H. tubulosa* (Tabela 5) je sličan sastavu lišaja *H. physodes*. Sadržaj 3-hidroksifizodične kiseline je približno jednak kod oba lišaja (14,8 % i 12,4%), kao i sadržaj atranorina (12,8 % i 12,4%) dok *H. tubulosa* sadrži veći procenat fizodične kiseline (47,2% i 22,8%) i manji procenat fizodalične kiseline (2,3% i 38,7%) u odnosu na *H. physodes* u slučaju acetonskih ekstrakata. Kod etarskih ekstrakata sadržaj fizodične kiseline i 3-hidroksifizodične kiseline je približno isti (31,9% i 11,3% za *H. tubulosa* ekstrakt i 30,7% i 16,5% za *H. physodes* ekstrakt) dok je sadržaj fizodalične kiseline značajno različit u oba slučaja 8,4% i 34,9%, redom. Prisustvo 4-*O*-metilfizodične kiseline je karakteristično za ispitivane *H. tubulosa* ekstrakte dok u *H. physodes* ekstraktima ova komponenta nije detektovana (Stojanović i saradnici, 2011).

Acetonski i etil-acetani ekstrakt *E. prunastri* sadrži atranorin u najvećem procentu (52,6% i 50,0%, redom) i everničnu kiselinu (31,3% i 29,2%, redom) dok je u etarskom ekstraktu glavna komponenta evernična kiselina (61,4%) praćena upola manjom količinom atranorina (26,3%). Atranorin je takođe glavna komponenta dihlormetanskog ekstrakta (64,0%) praćen hloratranorinom (17,8%) i everničnom kiselinom (15,4%). Zastupljenost usninske kiseline je slična u svim ekstraktima i iznosi oko 1% dok je evernična kiselina

REZULTATI I DISKUSIJA

zastupljena ispod 1% osim u etarskom ekstraktu gde nije detektovana. Hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *E. prunastri* dat je na Slici 13.



Slika 13. HPLC hromatogram etil-acetatnog ekstrakta lišaja *E. prunastri* (brojevi pored pikova odgovaraju brojevima jedinjenja iz Tabele 6)

Prethodna istraživanja Culbertsona i saradnika (1963) pokazuju da su evernična kiselina (depsid medule) atranorin i usninska kiselina (depsidi korteksa) metaboliti koji su uvek prisutni u ekstraktu *E. prunastri*. Ukupno 15 fenolnih komponenti izolovane su iz metanolnog ekstrakta *E. prunastri* (Gonzalez i saradnici, 2002) među njima su usninska kiselina, atranorin i evernična kiselina, što je u skladu sa našim rezultatima. Takođe je identifikovano 170 komponenti u „oakmos” ekstraktu od čega je ukupno 47 depsida pri čemu nisu dati podaci o procentnom sadržaju individualnih komponenti. Osim navedenih metabolita Kosanić i saradnici (2013) su detektovali fizodičnu kiselinu što nije u skladu sa našim rezultatima.

Intenziteti HPLC signala su pokazali da ekstrakciona sposobnost rastvarača opada u nizu: aceton, etil-acetat, etar i dihlormetan (odnos HPLC signala A : EA : E : DCM = 3,8 : 3 : 2,8 : 2 za *E. prunastri*; 11 : 4 : 10 : 1; za *H. tubulosa*; 30 : 25 : 3 : 0,1 za *U. crustulosa*; 200 : 1 : 0,2 : 0,5 za *U. cylindrica*), favorizujući aceton kao rastvarač za ekstrakciju lišajevskih supstanci.

REZULTATI I DISKUSIJA

Uporedna HPLC analiza *U. crustulosa* ekstrakata

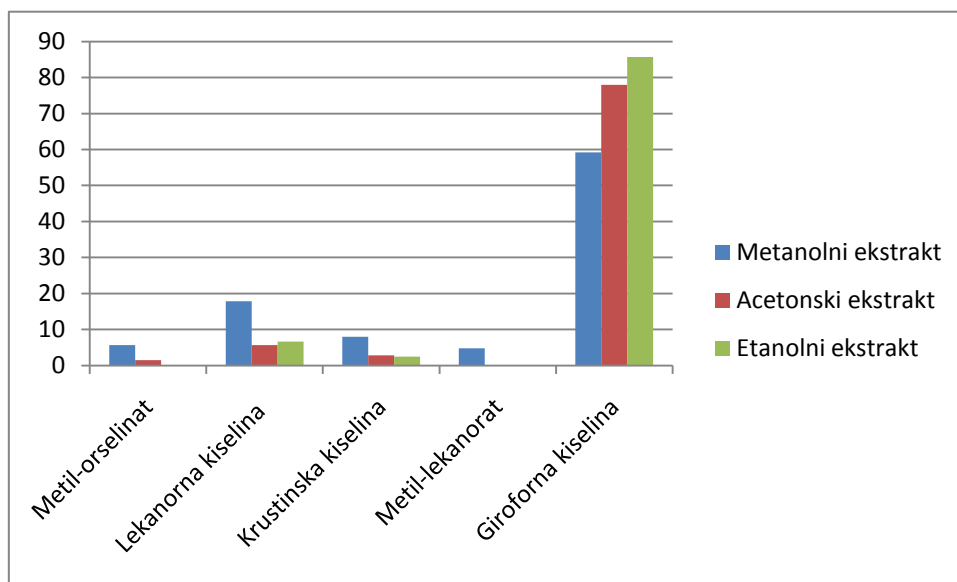
Da bi se utvrdilo da li su metil-estri integralne komponente lišaja ili artefakti nastali u procesu ekstrakcije izvršena je analiza acetonskog, metanolnog i etanolnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* na osnovu njihovih HPLC hromatograma. Analiza je pokazala da etanolni i acetonski ekstrakt imaju sličan sastav različit od metanolnog ekstrakta. Rezultati su dati u Tabeli 7.

Tabela 7. Relativna zastupljenost (%) komponenti detektovanih u *U. crustulosa* ekstraktima

Komponenta	A	B	C
Metil-orselinat (3)	5,7	1,5	0,9
Lekanorna kiselina (6)	17,9	5,7	6,7
Krustinska kiselina (7)	8,0	2,8	2,5
Metil-lekanorat (17)	4,8	/	/
Giroforna kiselina (11)	59,2	78,0	85,7

A (metanolni ekstrakt); B (acetonski ekstrakt); C (etanolni ekstrakt) (brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima jedinjenja iz Tabele 6)

Značajnu razliku u hemijskom profilu proučavanih ekstrakata činilo je prisustvo/odsustvo estara lišajevskih kiselina što se uočava na histogramu (Slika 14).



Slika 14. Relativna zastupljenost komponenti u acetonskom, metanolnom i etanolnom ekstraktu *U. crustulosa*

Na osnovu hemijskog sastava etanolnog ekstrakta (nisu detektovani odgovarajući etil-estri) i činjenice da tretiranje acetonskog i etanolnog ekstrakta metanolom ne dovodi do promena u njihovom sastavu, izgleda da detektovani metil-estri nisu artefakti nastali u toku

REZULTATI I DISKUSIJA

ekstrakcije. Manji sadržaj metil-orselinata i odsustvo metil-lekanorata u acetonskom i etanolnom ekstraktu u odnosu na metanolni je verovatno posledica različite rastvorljivosti ovih jedinjenja u metanolu, etanolu i acetonu.

4.1.2. GC-MS analiza etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakta

Sastav isparljivih komponenti ispitivanih ekstrakata dat je u Tabelama 8 i 9. Odabrani hromatogrami su prikazani na Slikama 15, 17 i 20 a ostali su dati u Prilogu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 8. Hemijski sastav isparljivih komponenti ekstrakta lišaja *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *H. tubulosa* i *E. prunastri* određen GC-MS analizom

RB	CR (%)			CY (%)			HT (%)			EP (%)		
	E	EA	DCM	E	EA	DCM	E	EA	DCM	E	EA	DCM
1	t	t	t	6,3	0,3	t	-	-	-	6,3	3,7	0,7
2	82,1	48,1	t	32,1	10,3	t	2,1	1,5	1,1	11,5	3,9	0,5
3	t	t	t	3,1	t	t	0,9	0,6	2,3	0,9	-	0,3
4	t	t	1,5	22,1	t	6,2	-	-	-	-	-	-
5	t	0,7	t	t	1,1	t	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7	0,5
7	t	t	1,4	21,1	2,3	4,3	-	-	-	-	-	-
8	1,2	3,5	12,5	14,1	8,5	2,7	7,4	8,5	54,6	21,1	51,1	52,3
9	4,1	2,5	t	t	t	t	-	-	-	-	-	-
10	10,5	40,5	t	t	t	t	-	-	-	1,2	0,9	1,6
11	t	0,6	t	t	t	t	-	-	-	-	-	-
12	t	1,3	t	t	1,5	t	-	-	-	-	-	-
13	t	t	37,4	t	28,6	46,3	-	-	-	-	-	-
14	t	t	43,4	t	38,9	34,8	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	1,6	3,7	9,4	3,9	6,4	7,8
16	-	-	-	-	-	-	6,3	9,8	24,5	6,8	12,2	11,7
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	t	0,2
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	0,8	4,0
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24,2	4,5	-
20	-	-	-	-	-	-	14,8*	15,1*	25,1*	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,9	1,8	-
22	-	-	-	-	-	-	28,3	22,0	5,1	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	16,4	19,8	1,5	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	17,2	5,6	0,8	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	5,7	3,9
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,6	0,1
Ukupno	97,9	97,2	96,2	99,1	91,5	94,3	95,8	96,5	99,3	87	92,3	83,6

RB-redni broj komponenti datih u Tabeli 9; *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *H. tubulosa* (HT) i *E. prunastri* (EP); etarski (E), etil-acetatni (EA) i dihlormetanski (DCM) ekstrakt

REZULTATI I DISKUSIJA

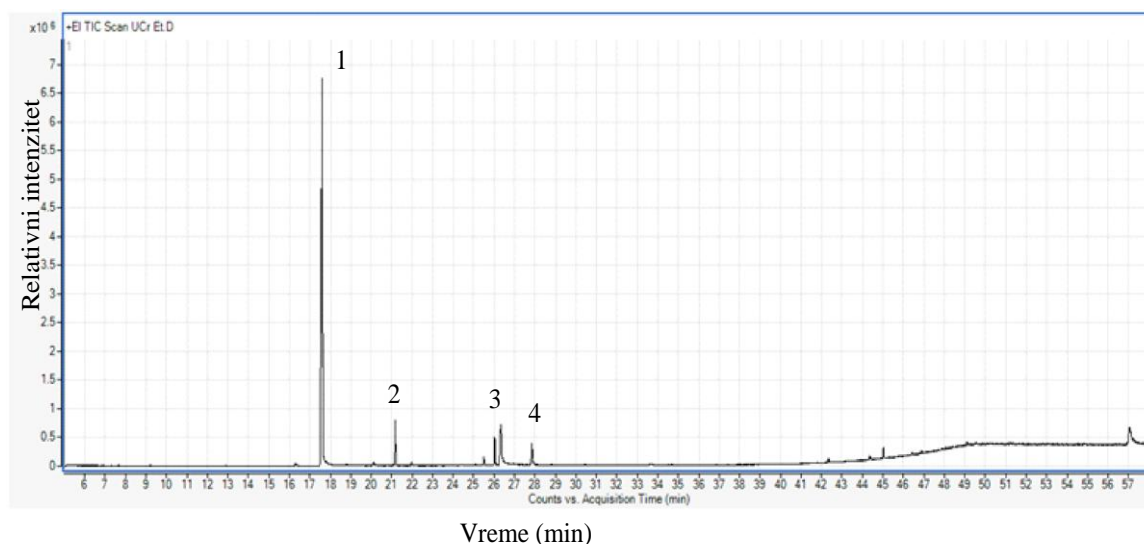
Tabela 9. RI, RL i sinonimi isparljivih komponenti identifikovanih u ekstraktima ispitivanih lišajeva

Redni broj	RI	RL	Komponenta	Sinonimi
1	1319	1317 ^{a,b}	3-metoksi-5-metilfenol	Orcinol-monometil- etar
2	1370	1369 ^{a,b}	5-metilbenzen-1,3-diol	Orcinol
3	1418	1419 ^c	2,5-dimetilbenzen-1,3- diol	β -orcinol
4	1472	1474 ^d	<i>n</i> -dodekanol	Laurik alkohol
5	1550	-	2,4-dihidroksi-6- metilbenzaldehyd	Orcinaldehyd
6	1660	1659 ^c	metil-2,4-dihidroksi-6- metilbenzoat	Metil-orselinat
7	1690	-	tetradekanol	-
8	1709	1706 ^c	metil-2,4-dihidroksi-3,6- dimetilbenzoat	Atrarična kiselina
9	1735	-	etil-2,4-dihidroksi-6- metilbenzoat	Etil-orselinat
10	1743	1745 ^b	2,4-dihidroksi-6- metilbenzojeva kiselina	Orselinska kiselina
11	1958	1958 ^b	<i>n</i> -heksadekanska kiselina	Palmitinska kiselina
12	2130	2128 ^b	(<i>Z,Z</i>)-9,12- oktadekadienska kiselina	Linolenska kiselina
13	2823	-	sterol 1	-
14	2873	-	sterol 2	-
15	1498	1494 ^c	3-hloro-2,6-dihidroksi-4- metilbenzaldehyd	Hloroatranol
16	1554	1549 ^c	2,6-dihidroksi-4- metilbenzaldehyd	Atranol
17	1585	1580 ^b	metil-2-hidroksi-4- metoksi-6-metilbenzoat	Sparazol
18	1669	1666 ^c	metil-3-formil-2,4- dihidroksi-6-metilbenzoat	Metil-hematomat
19	1685	-	2-hidroksi-4-metoksi-6- metil benzojeva kiselina	Evernična kiselina
20	1708	-	4-pentil-1,3-benzendiol*	4-pentilrezorcinol
21	1752	1746 ^a	etil-3-formil-2,4- dihidroksi-6-metilbenzoat	Etil-hematomat

REZULTATI I DISKUSIJA

22	1758	1755 ^b	5-pentil-1,3-benzenediol	Olivetol
23	2300	2290 ^b	6,7,8-trihidroksi-3-pentilizohromen-1-on	3-hidroksi-olivetonid
24	2344	2337 ^b	6,8-dihidroksi-3-pentilizohromen-1-on	Olivetonid
25	2734	2738 ^a	2,6-diacetil-3,7,9-trihidroksi-8,9b-dimetil-9b-dibenzofuran-1-on	Usninska kiselina
26	2818		ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol	Ličesterol

RI –eksperimentalni retencioni indeksi; RL – literaturni retencioni indeksi; a – Zrnzević i saradnici (2015); b – Stojanović i saradnici (2011); c – Mitrović i saradnici (2014); d – Heinrich i saradnici (2002). $t > 0.1$; *uslovno identifikovan kao 4-pentil-1,3-benzendiol MS, 70 eV, m/z (rel. int.): 123 (100 %), 180 (43.3 %), 124 (36.6 %), 67 (5.6 %), 181 (5.3 %), 95 (4.2%), 110 (3.2 %), 77 (3%), 125 (2.9%), 55 (2.8%)



Slika 15. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* (1-orcinol, 2-atrarična kiselina, 3-etil-orselinat, 4-orselinska kiselina)

Orcinol je glavna komponenta, etarskog i etil-acetatnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* (82,1% i 48,1%) dok je orselinska kiselina druga komponenta po zastupljenost (10,5% i 40,5%, redom). S druge strane u dihlormetanskom ekstraktu najzastupljeniji su steroli (81,3%) praćeni atraričnom kiselinom (12,5% i 2,7%). Palmitinska i linolenska kiselina su zastupljene oko 2 % u etil-acetatnom ekstraktu dok je njihova količina ispod 0,5% u etarskom i dihlormetanskom ekstraktu.

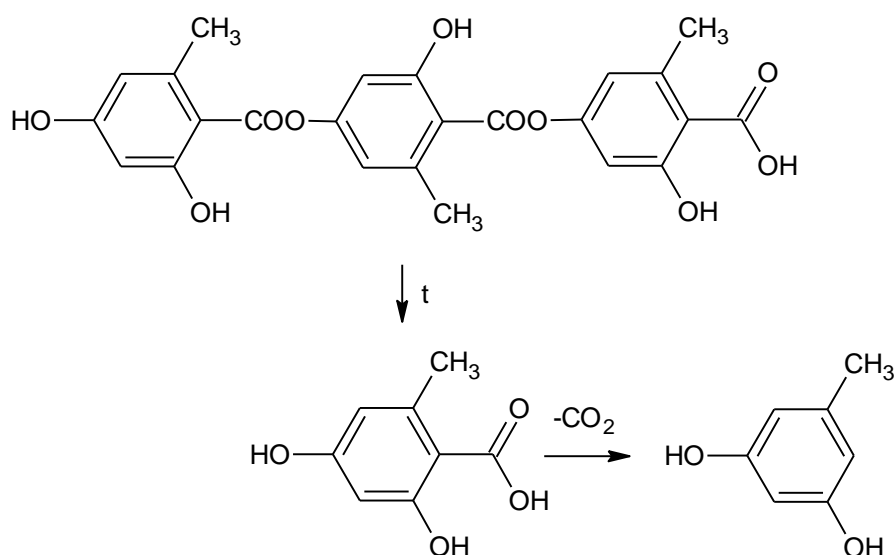
Analizom ekstrakata lišaja *U. cylindrica* utvrđeno je prisustvo orcinola (32,1%) i atrarične kiseline (14,1%) kao dominantnih komponenti u etarskom ekstraktu. Dihlormetanski i etil-acetani ekstrakti sadrže sterole u visokom procentu (81,5% i 67,5 %) praćene manjim procenatom atrarične kiseline (2,7% i 8,5%). Ukupna zastupljenost

REZULTATI I DISKUSIJA

dodekanola i tetradekanola je veća u etarskom (43,2%) nego u dihlormetanskom (10,5%) i etil-acetatnom ekstraktu (2,3%).

U svim ispitivanim uzorcima *U. crustulosa* i *U. cylindrica* detektovani su steroli-nearomatične komponente, što je u skladu sa objavljenim rezultatima (Posner i sardnici, 1992). Količina sterola varira u okviru vrste u zavisnosti od rastvarača korišćenog za ekstrakciju. Ispostavilo se da je ukupan procenat sterola veći u svim ekstraktima *U. cylindrica* nego u *U. crustulosa*. Neki autori smatraju da su steroli integralne komponente lišajeva dok drugi veruju da su steroli migrirali sa drveta domaćina u lišaj (Joulain i Tabbachi, 2009). U ovom slučaju steroli su integralni metaboliti lišaja s obzirom da ispitivani uzorci rastu isključivo na stenama a steroli nisu detektovani u vrstama koje su sakupljene na drveću kao što su *H. tubulosa* i *E. prunastris*.

Postavlja se pitanje da li su mono-aromatične komponente integralni sastojci lišajeva ili nastaju kao artefakti u procesu izolovanja i identifikacije. Orselinska kiselina i orcinol mogu nastati u procesu termalne dekarboksilacije giroforne kiseline u toku GC-MS analize (Slika 16). Gasno-hromatografska analiza izolovane giroforne kiseline je pokazala da je orcinol glavna komponenta praćen orselinskom kiselinom i njenim estrima. Detektovanje metil-orselinata u ekstraktima lišaja *U. crustulosa*, i HPLC analizom, dalo je potvrdu da su ovo integralne komponente lišajeva a ne samo degradacioni produkti.



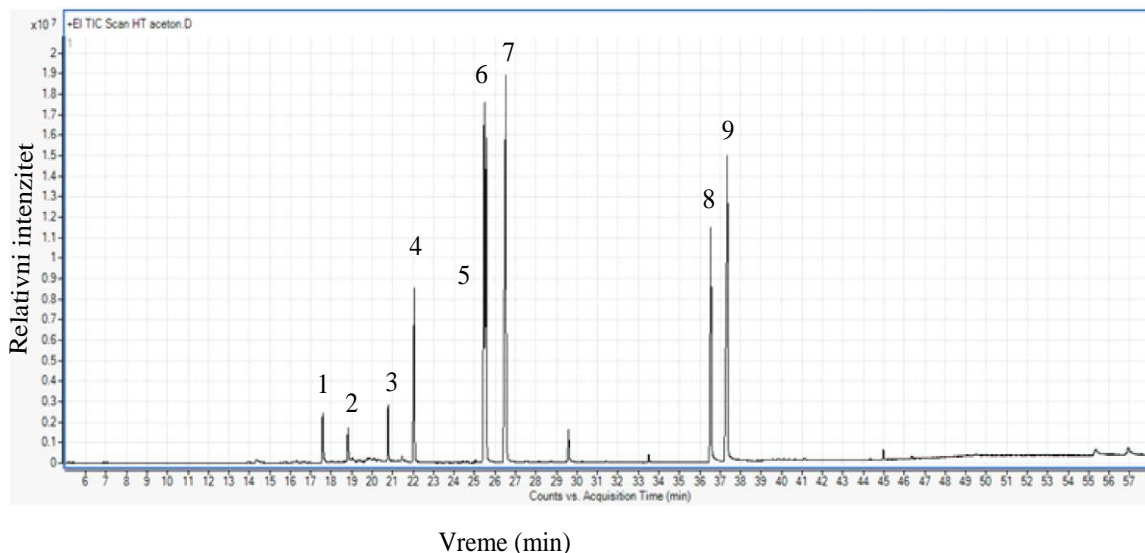
Slika 16. Termalna degradacija giroforne kiseline i formiranje orcinola dekarboksilacijom orselinske kiseline

Etarski i etil-acetani ekstrakti *U. crustulosa* sadrže veće količine orcinola u odnosu na *U. cylindrica* ekstrakte. Atrarična kiselina je detektovana u svim ispitivanim uzorcima u

REZULTATI I DISKUSIJA

značajnom procentu. Kod etil-acetatnog ekstrakta procentna zastupljenost atrarične kiseline je tri puta veća u ekstraktu *U. cylindrica* u odnosu na ekstrakt *U. crustulosa*.

Atranol, hloratranol, 4-pentilrezorcinol, atrarična kiselina, olivetol, olivetonid i 3-hidroksiolivetonid su identifikovane kao glavni komponente *H. tubulosa* ekstrakata (Tabela 7 i Slika 17).

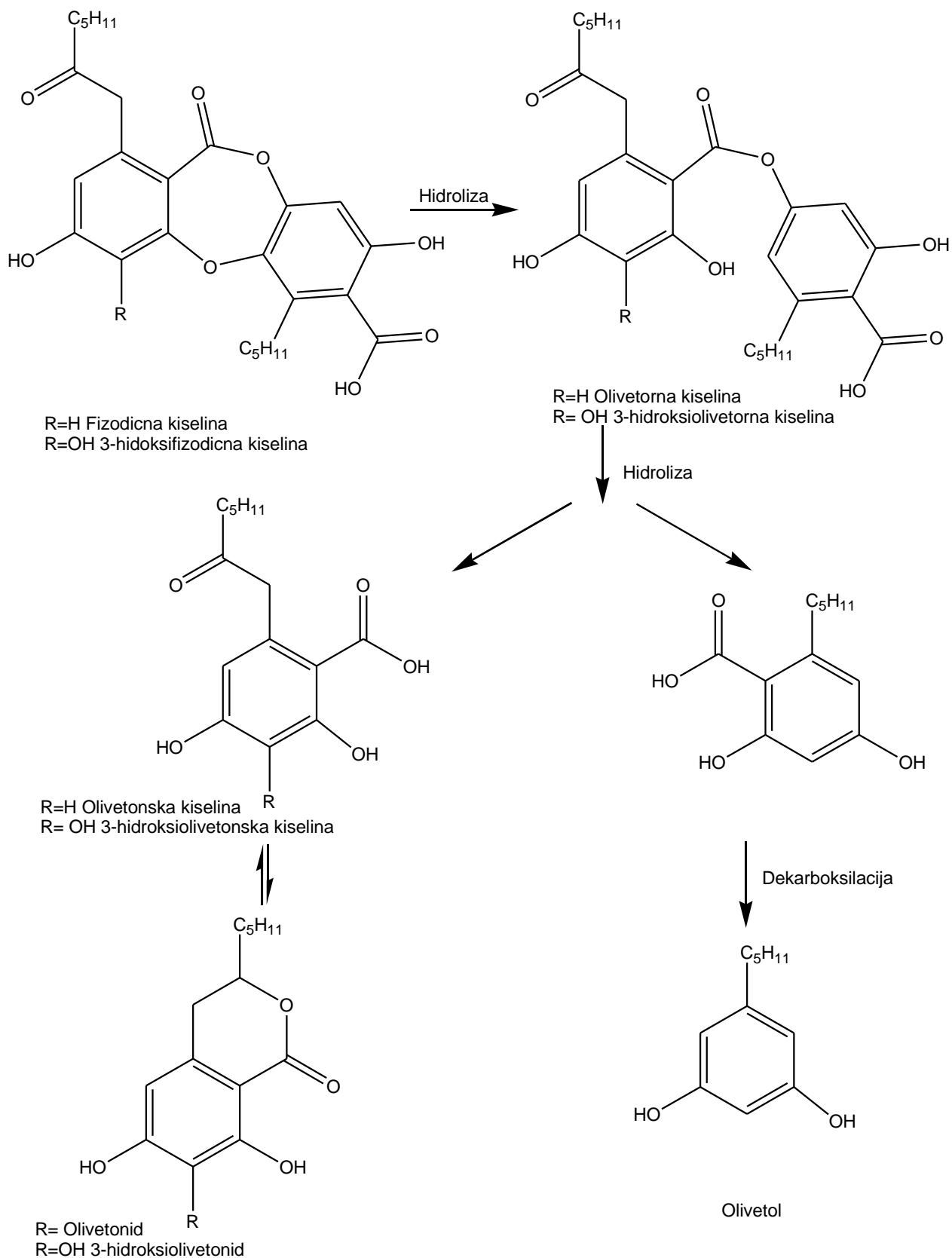


Slika 17. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *H. tubulosa*

(1-orkinol, 2- β -orkinol, 3-hloratranol, 4-atranol, 5 -4-pentyl-1,3-benzendiol, 6-atrarična kiselina, 7-olivetol, 8- 3-hidroksi olivetonid, 9- olivetonid)

Proizvod hidrolize olivetorne i 3-hidroksiolivetorne kiseline su olivetonska kiselina i 3-hidroksiolivetonska kiselina, čiji enolni oblici laktonizacijom daju odgovarajući olivetonide (Slika 18). Olivetonidi su detektovani u ekstraktima *Pseudoevernia furfuracea* i *H. physodes* (Joulain i Tabacchi 2009, Mitrović i saradnici, 2014; Stojanović i saradnici, 2011) dok je 3-hidroksiolivetonid detektovan samo u ekstraktu *P. furfuracea* (Joulain i Tabacchi, 2009). 4-pentilrezorcinol je komponenta po kojoj se ekstrakti *H. tubulosa* razlikuju od ekstrakata lišaja *H. physodes*.

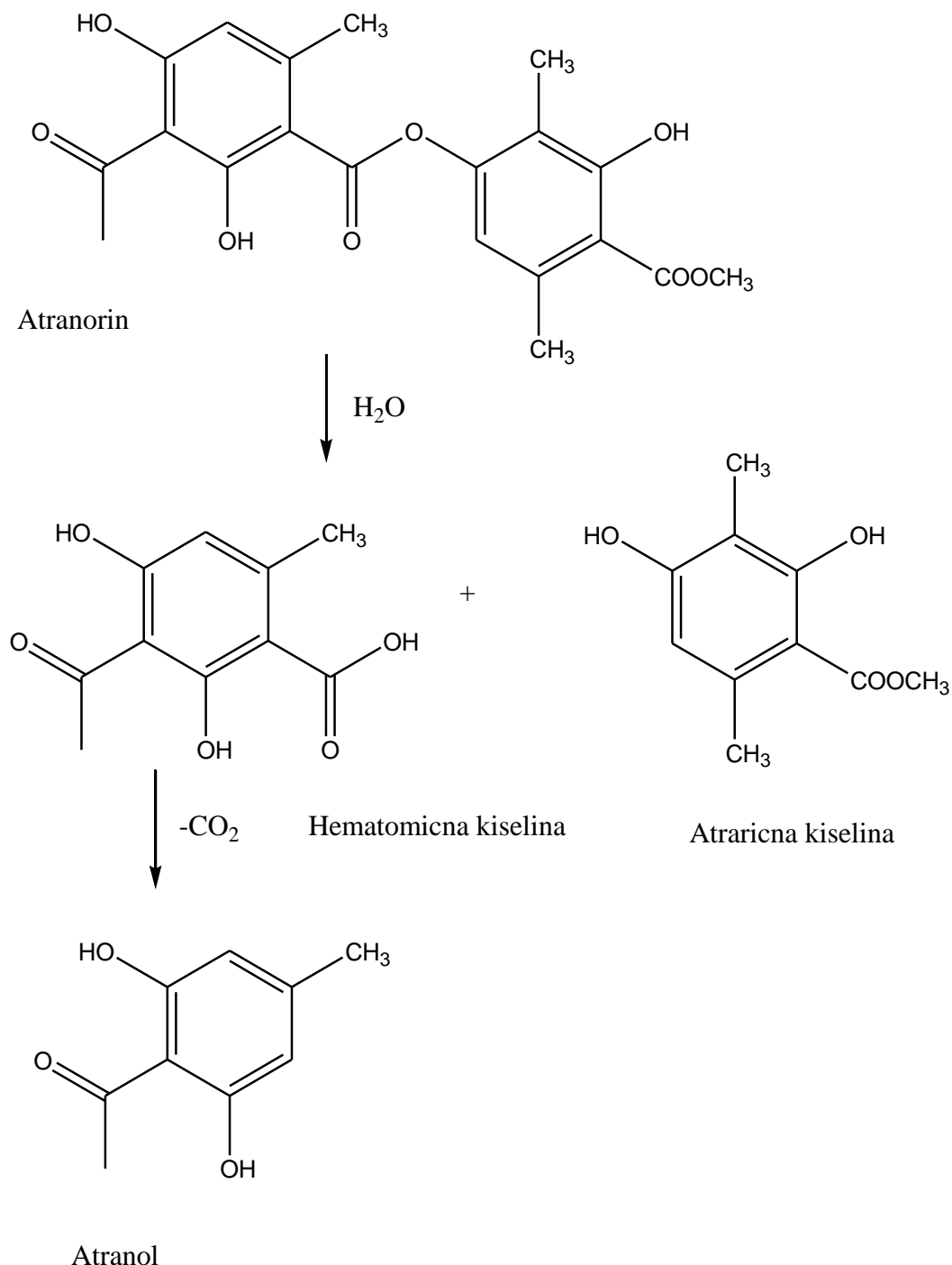
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 18. Proizvodi hidrolize i dekarboksilacije fizodične i 3-hidroksifizodične kiseline

REZULTATI I DISKUSIJA

Hidrolizom atranorina nastaje metil- β -orcinol-karboksilat (atrarična kiselina) i hematomična kiselina čijom dekarboksilacijom nastaje atranol (Slika 19) (Stojanovic i saradnici, 2011).

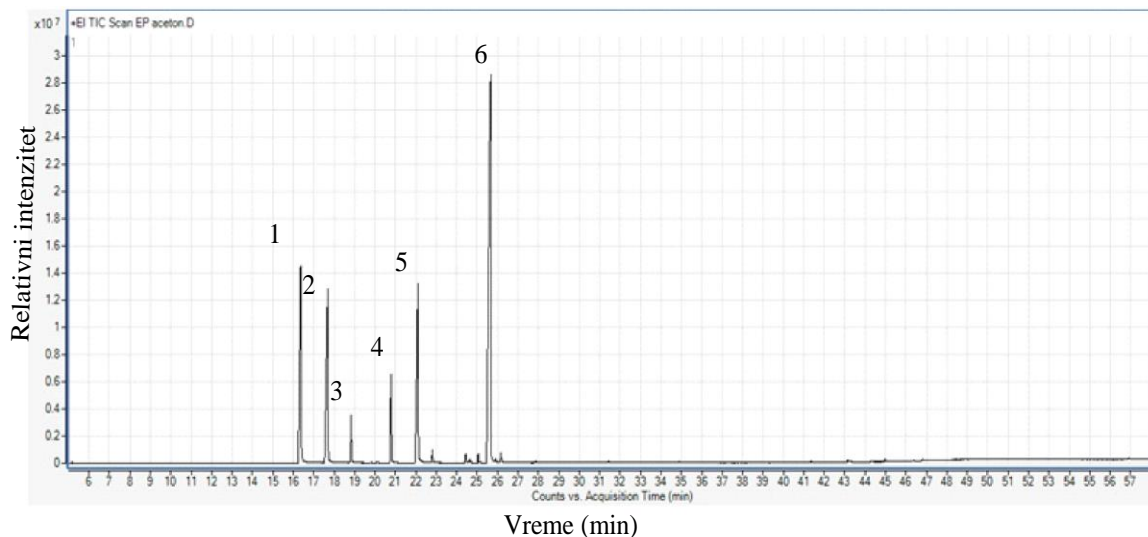


Slika 19. Hidroliza atranorina do atrarične kiseline i hematomične kiseline i njena dekarboksilacija do atranola

Hloratranol nastaje kao degradacioni proizvod hloratranorina preko hlorhematomične kiseline (Joulain i Tabacchi 2009). Everninična kiselina (24,2% i 4,5%) i orcinol (11,5% i

REZULTATI I DISKUSIJA

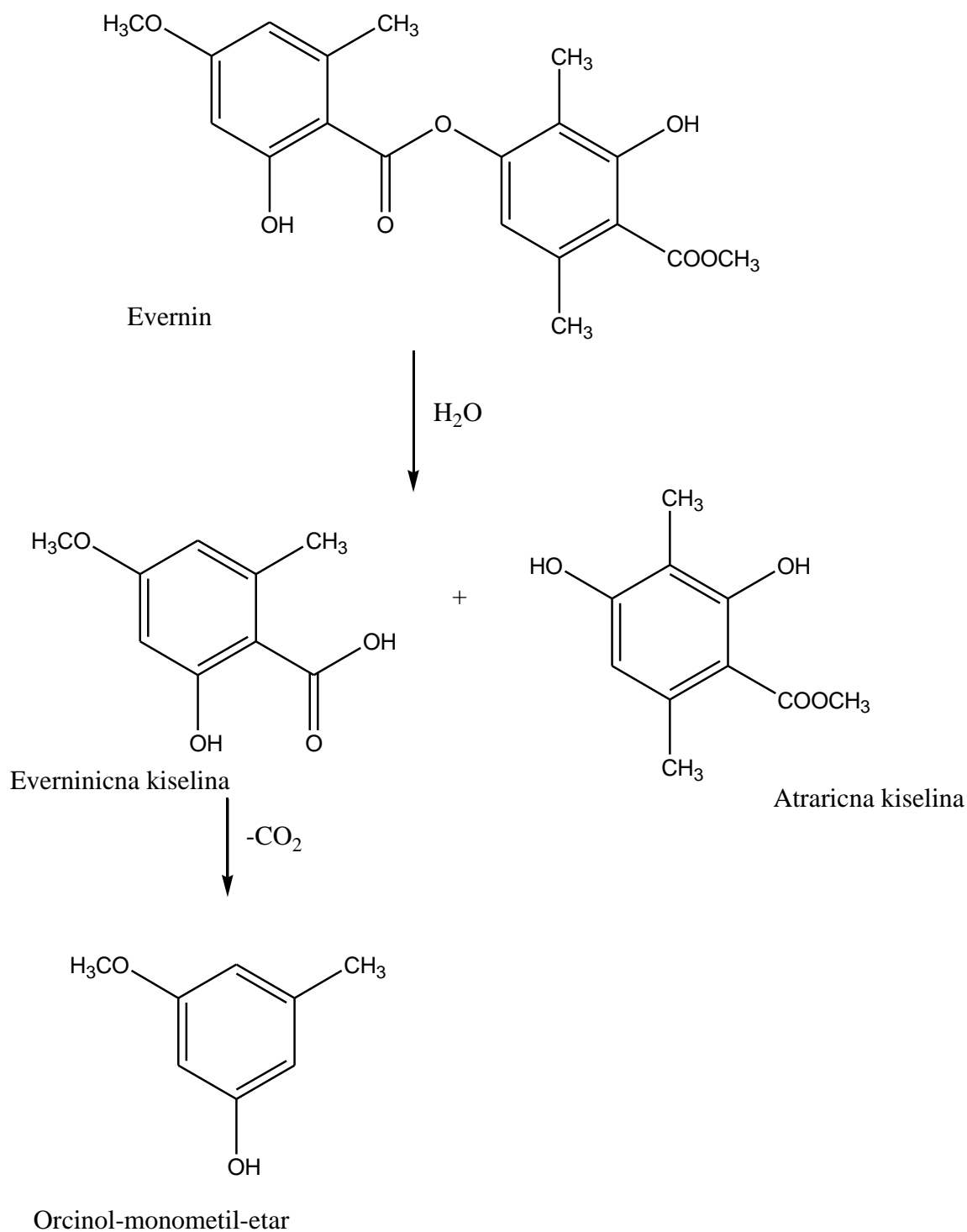
3,9%) su glavne monoaromatične komponente prisutne u etarskom i etil-acetatnom ekstraktu *E. prunastri*. Poznato je da hidrolizom evernina i atranorina nastaje atrarična kiselina (metil- β -orcinolkarboksilat) koja je detektovana u svim ekstraktima (Joulain i Tabacchi, 2008). Orcinol-monometil-etar može nastati tokom dekarboksilacije everninične kiseline i identifikovan je u svim ekstraktima u različitim količinama (Slika 21).



Slika 20. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *E. prunastri*

(1-orcinol-monometil etar, 2-orcinol, 3- β -Orcinol, 4-hloratranol, 5-atranol, 6-atrarična kiselina)

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 21. Hidroliza evernina do atrarične kiseline i everninične kiseline i dekarboksilacija everninične kiseline do orcinol-monometil-etra

Usninska kiselina je jedina komponenta sa dibenzofuranskom strukturom detektovana u različitom procentu u svim *E. prunastri* ekstraktima (5,7; 2,5; 3,9%). Joulain i Tabacchi (2008) su zabeležili sličan sastav isparljivih komponenti ali i prisustvo steroida i terpenoida. U acetonskoj frakciji metanolnog ekstrakta *E. prunastri* su identifikovani atrarična kiselina (30,1%) i orcinol (25%) kao glavne komponente (Stojanović i saradnici, 2011).

REZULTATI I DISKUSIJA

4.1.3. NMR analiza

Primenom preparativne HPLC metode izolovana su 4 jedinjenja iz metanolnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* (Slika 22). Na osnovu rezultata ^1H , ^{13}C i 2D-NMR eksperimenata, utvrđeno je da su ova jedinjenja: metil-orselinat (3), lekanorna kiselina (6), metil-lekanorat (17) i giroforna kiselina (11).

Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim i predstavljeni su u Tabelama 10 i 11 (Huneck i saradnici, 1996; Narui i saradnici, 1998). Dodatak postojećim podacima jeste identifikacija metil-orselinata i metil-lekanorata na osnovu 2D NMR spektara (HMBC i NOESY). Strukture jedinjenja su date na Slici 22 a spektri u Prilogu.

Tabela 10. ^1H hemijska pomeranja (ppm) metil-orselinata (3), lekanorne kiseline (6), metil-lekanorata (17) i giroforne kiseline (11) izolovanih iz metanolnog ekstrakta *U. crustulosa*

Protoni	3	6	17	11
H-3	6,28 (d, J=1.8Hz)	6,22 (bs)	6,22 (bs)	6,24 (bs)
H-5	6,24 (d, J=1.8Hz)	6,22 (bs)	6,21 (bs)	6,24 (bs)
H-3'/H-3''		6,44	6,60 (bs)	6,54 (bs) 6,67 (bs)
H-5'/H-5''		6,39	6,58 (bs)	6,50 (bs) 6,67 (bs)
H-8	2,49 (s)	2,36 (s)	2,34 (s)	2,35 (s)
H-8'		2,46 (s)	2,23 (s)	2,36 (s)
H-8''				2,46 (s)
-OH*	11,72 (s)	10,39 (s)		10,31 (s)
		10,03 (s)		10,47 (s)
		11,62 (s)	10,32 (s)	10,01 (s)
-COOCH ₃	3,92 (s)		3,81 (s)	

s-singlet, bs-broad singlet, d-dublet, protoni 2,4, 2', 4', 2'' i 4'' -OH ili COOH grupe

*pomeranja kiselih H atoma

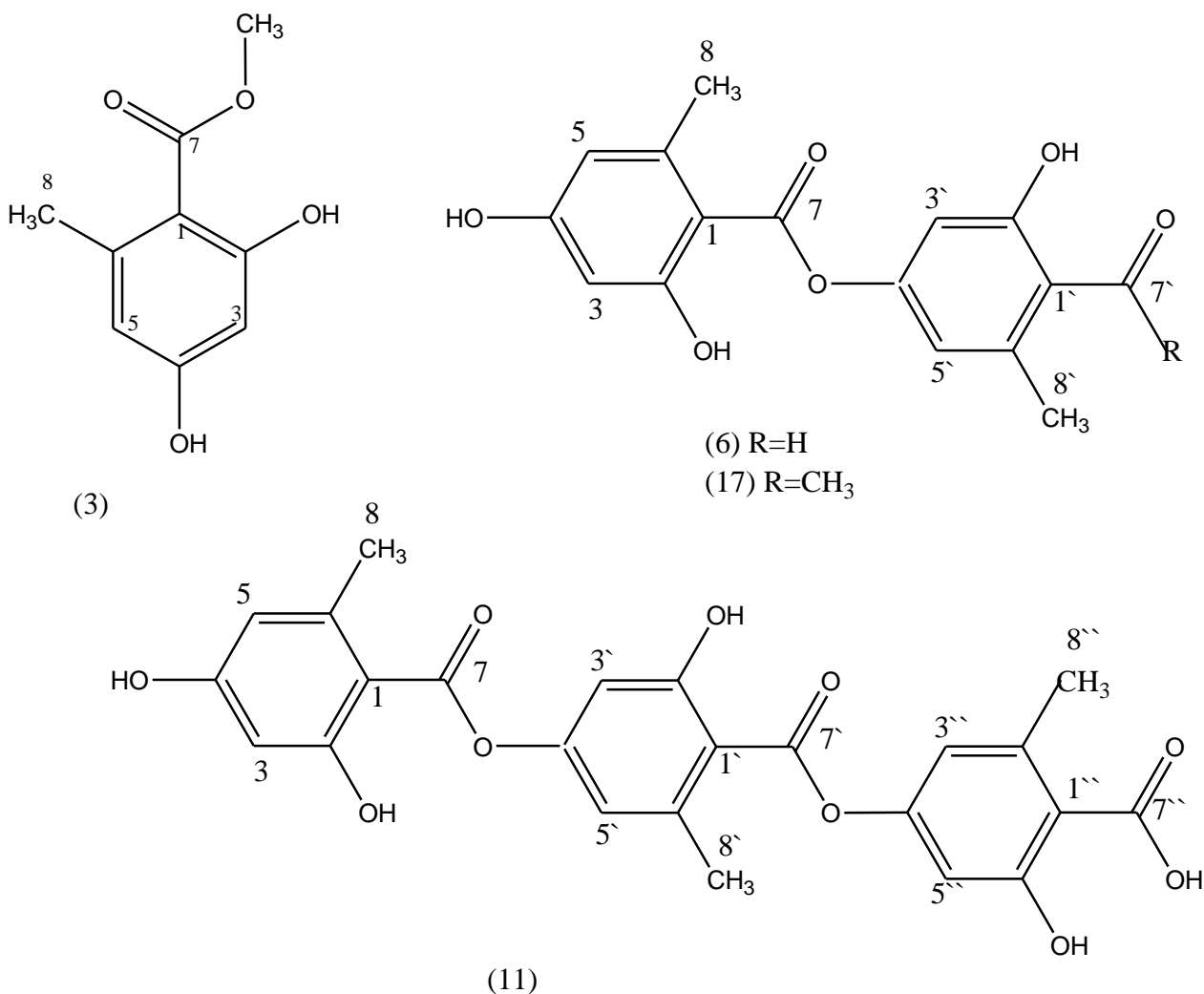
REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 11. ^{13}C hemijska pomeranja (ppm) metil-orselinata (3), lekanorne kiseline (6), metil lekanorata (17) i giroforne kiseline (11) izolovanih iz metanolnog ekstrakta *U. crustulosa*

Ugljenikovi atomi	3	6	17	11
C1	105,76	108,09	109,36	108,41
C2	165,57	160,26	157,80	159,82
C3	101,28	100,39	100,98	100,39
C4	160,16	161,03	160,54	160,95
C5	111,25	109,84	110,75	109,69
C6	144,00	140,29	139,20	140,07
C7	172,00	167,32	167,70	167,02
C8	24,24	21,40	21,8	21,15
-COOCH ₃	51,87	116,35	119,22	118,06
C1'				
C2'		162,95	156,68	156,14
C3'		107,20	107,55	107,08*
C4'		151,58	152,14	151,95
C5'		113,25	114,58	114,11*
C6'		140,92	138,54	137,82
C7'		171,13	169,73	165,62
C8'		22,08	19,91	19,21
-COOCH ₃			52,44	
C1''				116,98
C2''				162,93
C3''				107,03
C4''				151,74
C5''				113,51
C6''				140,25
C7''				170,65
C8''				21,47

*pomeranje može biti i obrnuto za C3' i C5'

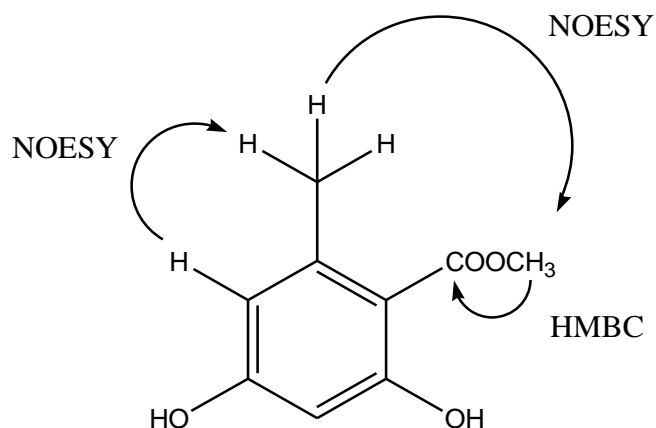
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 22. Strukture izolovanih komponenti (3) metil-orselinat, (6) lekanorna kiselina, (17) metil-lekanorat, (11) giroforna kiselina

Interakcija protona na 3,94 ppm sa protonima metil-grupe (C8-H) na 2,43 ppm ukazuje da su ove grupe bliske u prostoru. Takođe, C6 metil-grupa (144 ppm) i H5 atom (6,28 ppm) pokazuju sličnu interakciju. Kao što se može pretpostaviti postoji HMBC interakcija između protona na 3,94 ppm sa C atomom na 172,13 ppm kod metil-orselinata što je predstavljeno na Slici 23.

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 23. Odabrane NOESY i HMBC korelacije u 2D spektrima metil-orselinata

U slučaju metil-lekanorata interakcija između protona na 3,81 ppm i C atoma na 169,73 ppm (C7') ukazuje na estraski vezanu metil-grupu u jedinjenju metil-lekanorata. Razlika se primećuje u hemijskom pomeranju karbonilnog C atoma u zavisnosti od supstituenata, ArCOOH i ArCOOCH₃ imaju veće δ vrednosti od ArCOOAr (C7, C7', C7''). Razlika u hemijskom pomeranju H3 i H5 atoma je dovoljno velika da se pojave kao odvojeni signali samo u metil-orselinatu dok se u komponentama 6, 17 i 11 pojavljuju kao široki singleti. Takođe, H3' i H5' protoni u komponentama 6, 17 i 11 kao i H3'' i H5'' kod komponente 11 imaju izgled širokog singleta (bs-broad singlet) usled čega nije moguće odrediti konstante kuplovanja. Samim tim konstante kuplovanja mogu se odrediti samo za H3 i H5 protone kod komponente 3. Vrednost ove konstante je 1,8 Hz što je karakteristično za *meta* kuplovanje.

NMR analizom acetonskog, metanolnog i etanolnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* ustanovljeno je prisustvo metil-grupe na 3,9 ppm-a u svim ekstraktima što je još jedna potvrda da su metil-estri integralne komponente ekstrakta.

4.1.4. Specifična aktivnost radionuklida ⁴⁰K, ¹³⁷Cs, ²²⁶Ra i ²³²Th u lišaju *E. prunastri*

Za određivanje specifične aktivnosti radionuklida na dostupnom aparatu bila je potrebna količina od najmanje pola kilograma materijala što je moglo biti obezbeđeno samo za *E. prunastri* te je nevedena analiza urađena samo za ovaj uzorak.

Aktivnost ⁴⁰K je iznosila 108 Bq kg⁻¹ dok su aktivnosti ¹³⁷Cs, ²²⁶Ra i ²³²Th ispod minimalnih detekcionih aktivnosti koje iznose 3 Bq kg⁻¹ za ¹³⁷Cs, 20 Bq kg⁻¹ za ²²⁶Ra i 15 Bq kg⁻¹ za ²³²Th.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 12. Specifična aktivnost radionuklida u lišaju *E. prunastri*

Uzorak	Masa (g)	Specifična aktivnost (Bq kg ⁻¹)			
		¹³⁷ Cs	²²⁶ Ra	²³² Th	⁴⁰ K
<i>E. prunastri</i>	72,85	< 3	< 20	< 15	108±9

Specifična aktivnost ⁴⁰K u uzorku *E. prunastri* dobijena u ovoj analizi je u skladu sa vrednostima dobijenim za specifičnu aktivnost ⁴⁰K u istoj vrsti lišaja uzorkovanog na nekoliko tačaka na području R. Srbije (Dragovic i saradnici, 2010).

Cezijum-137 je glavni izvor dugoročnog zagađenja nakon atmosferskih testiranja atomskih bombi i nakon nuklearnih akcidenata. U pitanju je jedan od najproblematičnijih produkata fisije jer se lako širi u prirodi usled visoke rastvorljivosti njegovih komponenti u vodi. Lišajevi se koriste kao bioindikator, zbog njihove sposobnosti da zadrže dugo živeće radionuklide kao što je ¹³⁷Cs, usled velike površine po jedinici mase (poznatiji kao efekat površine) (Papastefanou i saradnici, 1989). Kalijum-40 je prirodni radionuklid sa dugim vremenom poluraspada od 1,25×10⁹ i biološkim vremenom poluraspada od 30 dana. Prirodni torijum-232 je takođe dugo živeći radionuklid (vreme poluraspada je 1,6×10⁶ godina) i njegov radioaktivni lanac je značajan izvor radiogenog zagađenja na Zemlji. Vreme poluraspada radijuma-226 je 1600 godina i njegovo biološko vreme poluraspada iznosi 45 dana. Radijum 226 nastaje u lancu raspada ²³⁸U i može se naći u stenama i zemljištu koje sadrže prirodni uranijum (Čučulović i saradnici, 2012).

Godinu i po dana nakon Černobila, u novembru 1987, specifične aktivnosti ¹³⁷Cs i ⁴⁰K u uzorcima *E. prunastri* sakupljenim u severnoj Grčkoj iznosile su u uzorku 1: ¹³⁷Cs 8 436±8 Bq kg⁻¹ i ⁴⁰K 71±8 Bq kg⁻¹; za uzorak 2: ¹³⁷Cs 3 242±7 Bq kg⁻¹ i ⁴⁰K 50±6 Bq kg⁻¹; za uzorak 3: ¹³⁷Cs 3 250±23 Bq kg⁻¹ i ⁴⁰K 50±13 Bq kg⁻¹ (Papastefanou i saradnici, 1989).

Specifične aktivnosti radionuklida u lišaju *E. prunastri* sakupljenom na prostoru bivše Jugoslavije merene u periodu od 01.07.1987. do 31.12.1987. su iznosile: 13 610 Bq kg⁻¹ kao prosečne aktivnosti ¹³⁵⁺¹³⁷Cs dok je u toku 1993 zabeležena vrednost od 815 Bq kg⁻¹. Takođe, u toku 1991-1994 na teritoriji južne Srbije zabeleženo je smanjenje aktivnosti ¹³⁷Cs (od 2 621 Bq kg⁻¹ na 1 902 Bq kg⁻¹). U 2002. godini aktivnosti ¹³⁷Cs i ⁴⁰K određene u uzorcima iz Crne gore bile su 373 Bq kg⁻¹ i 281 Bq kg⁻¹, redom, specifična aktivnost za ¹³⁷Cs bila 1,3 puta veća u odnosu na ⁴⁰K (Monografija 30 godina Cernobilja).

U periodu 1996-1998 specifične aktivnosti prirodnih radionuklida su iznosile 281±193 Bq kg⁻¹ za ⁴⁰K, 54±29 Bq kg⁻¹ za ²²⁶Ra i 19±11 Bq kg⁻¹ za ²³²Th dok su u periodu 2006 do

REZULTATI I DISKUSIJA

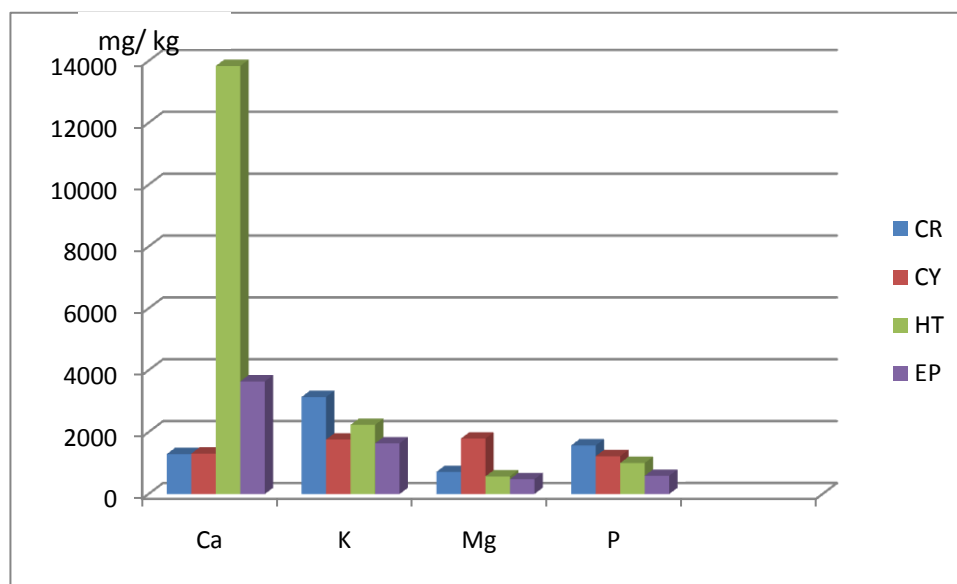
2010 aktivnosti radionuklida bile manje i iznosile su 207 ± 51 Bq kg⁻¹ za ⁴⁰K, 12 ± 5 Bq kg⁻¹ za ²²⁶Ra i 9 ± 2 Bq kg⁻¹ za ²³²Th. Aktivnost ¹³⁷Cs u uzorcima sakupljenim u Sokobanji 2006 godine je iznosila 14 ± 9 Bq kg⁻¹ dok je u periodu 2008-2010 na Đerdapu iznosila 283 ± 86 Bq kg⁻¹ (Čučulović i saradnici, 2012).

4.1.5 ICP-OES analiza

Rezultati ICP-OES određivanja sadržaja 19 elemenata (Ca, K, Mg, Na, P, Al, B, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Mn, Si, V, Zn, Ba, Cd, Pb) u analiziranim uzorcima lišajeva su dati u tabelama (13-14) i na slikama (24-25).

Tabela 13. Sadržaj makroelemenata u analiziranim lišajevima (srednja vrednost \pm SD, mg kg⁻¹)

Uzorak	<i>U. crustulosa</i>	<i>U. cylindrica</i>	<i>H. tubulosa</i>	<i>E. prunastri</i>
Element				
Ca	1293 \pm 29	1309 \pm 10	13843 \pm 82	3643 \pm 18
K	3138 \pm 11	1763 \pm 13	2238 \pm 9	1639 \pm 9
Mg	715 \pm 5	1793 \pm 11	570 \pm 8	480 \pm 2
Na	11,62 \pm 0,09	10,60 \pm 0,06	7,56 \pm 0,04	3,68 \pm 0,04
P	1572 \pm 4	1224 \pm 10	1004 \pm 7	589 \pm 5



Slika 24. Sadržaj makroelemenata (Ca, K, Mg, P) u lišajevima *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT)

Od makroelemenata najzastupljeniji je Ca u uzorku *H. tubulosa*. Određena vrednost je oko deset puta veća od sadržaja Ca u *U. crustulosa* i *U. cylindrica* i približno četverostruka od njegovog sadržaja u *E. prunastri*. Natrijum je najmanje zastupljen element u svim ispitivanim

REZULTATI I DISKUSIJA

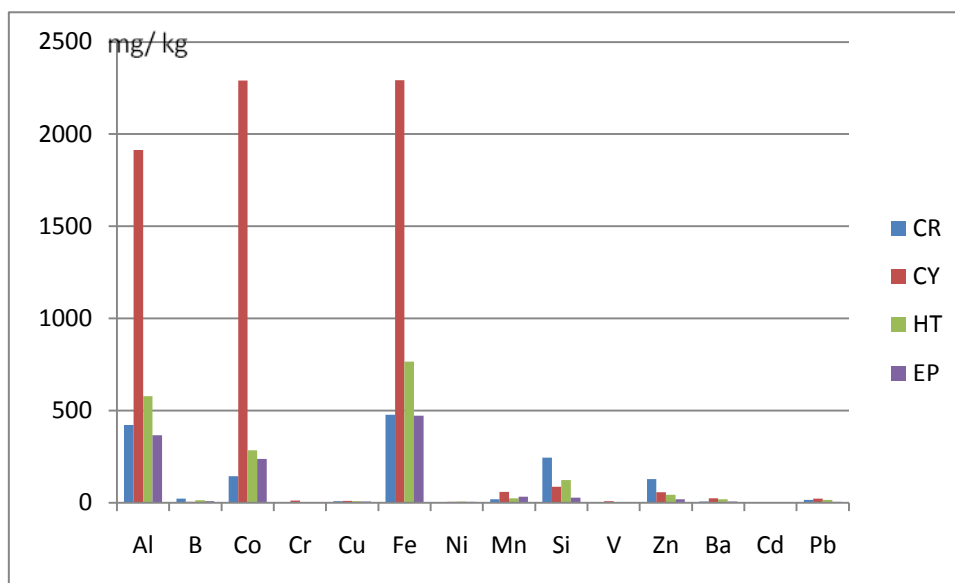
vrstama pri čemu je njegov sadržaj 3; 2,8 i 2 puta manji u frutikoznom lišaju *E. prunastri* u odnosu na foliozne lišajeve *U. crustulosa*, *U. cylindrica* i *H. tubulosa* (redom). Ispitivani lišajevi se najmanje razlikuju po sadržaju K (razlikuju se za manje od dva puta). Sadržaj Mg je najveći u *U. cylindrica* 3,7; 3,1 i 2,5 puta veći u odnosu na njegov sadržaj u *E. prunastri*, *H. tubulosa* i *U. crustulosa*, redom. Sadržaj P je najmanji u uzorku *E. prunastri* 2,7; 2,1 i 1,7 puta manji u odnosu na njegov sadržaj u *U. crustulosa*, *U. cylindrica* i *H. tubulosa*. Evidentno je da je frutikozni lišaj *E. prunastri* sa najmanjim sadržajem K, Mg, Na i P dok je *U. crustulosa* sa najvećim sadržajem K, Na i P.

Tabela 14. Sadržaj mikroelemenata u analiziranim lišajevima (srednja vrednost \pm SD, mg kg⁻¹)

Uzorak	<i>U. crustulosa</i>	<i>U. cylindrica</i>	<i>H. tubulosa</i>	<i>E. prunastri</i>	<i>EP*</i> <i>Cerje/Donje Vlase</i>
Element					
Al	421 \pm 4	1914 \pm 8	578 \pm 4	356 \pm 5	/
B	22,6 \pm 0,7	4,4 \pm 0,3	13,3 \pm 0,2	8,6 \pm 0,2	/
Co	144 \pm 22	2290 \pm 10	285 \pm 10	238 \pm 6	2,74/1,17
Cr	0,99 \pm 0,08	11,90 \pm 0,08	1,88 \pm 0,09	2,78 \pm 0,08	1,70/1,40
Cu	8,15 \pm 0,04	9,30 \pm 0,09	8,61 \pm 0,06	6,2 \pm 0,1	21,23/13,42
Fe	477 \pm 4	2293 \pm 9	766 \pm 6	471 \pm 4	374,75/273,11
Ni	0,967 \pm 0,007	4,74 \pm 0,04	5,52 \pm 0,05	5,01 \pm 0,06	2,42/1,63
Mn	18,23 \pm 0,09	58,4 \pm 0,3	23,64 \pm 0,07	32,1 \pm 0,2	15,07/15,67
Si	245 \pm 2	86,1 \pm 0,4	123 \pm 3	27,1 \pm 0,6	/
V	1,47 \pm 0,02	8,28 \pm 0,04	1,94 \pm 0,01	0,93 \pm 0,06	/
Zn	128,9 \pm 0,3	56,2 \pm 0,1	43,39 \pm 0,06	19,1 \pm 0,2	65,94/30,27
Ba	5,72 \pm 0,04	23,8 \pm 0,2	19,15 \pm 0,07	6,33 \pm 0,08	4,13/262,99
Cd	0,202 \pm 0,001	0,57 \pm 0,01	0,214 \pm 0,005	0,18 \pm 0,02	/
Pb	14,55 \pm 0,05	22,4 \pm 0,4	14,3 \pm 0,2	4,4 \pm 0,2	1,38/<1,17

*(Stamenkovic i saradnici, 2013), EP- *E. prunastri*

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 25. Sadržaj mikroelemenata u lišajevima *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT)

Ispitivani lišajevi se najmanje razlikuju po sadržaju Cu (razlikuju se za manje od dva puta). Najveće razlike se uočavaju u sadržaju Co i Cr čija je zastupljenost u *U. cylindrica* oko 16 odnosno 12 puta veća nego u uzorku *U. crustulosa* koji sadrži najmanju količinu Co i Cr, redom. Al i Fe su oko 5 puta a V oko 9 puta zastupljeniji, takođe, u uzorku *U. cylindrica* u odnosu na njihovu zastupljenost u ostalim uzorcima. *U. crustulosa* sadrži najveću količinu B, Si i Zn i to 5; 9 i 6,7 puta veću od njihovih sadržaja u uzorcima sa najmanjim sadržajem (*U. cylindrica*, *E. prunastri* i *E. prunastri*, redom). Najmanji sadržaj Ni zabeležen je u uzorku *U. crustulosa* i on je oko pet puta manji nego u ostalim ispitivanim uzorcima. Najveći sadržaj Ba, Cd i Pb uočen je u uzorku *U. cylindrica* i on je 4 puta veći za Ba od njegovog sadržaja u uzorku *U. crustulosa* koji ima najniži sadržaj od svih ispitivanih uzoraka; 3,2 puta veći sadržaj Cd od njegovog sadržaja u uzorku *E. prunastri* koji ima najniži sadržaj od svih ispitivanih uzoraka, dok je sadržaj Pb 5,1 puta veći od njegovog sadržaja u uzorku *E. prunastri* koji ima najniži sadržaj od svih ispitivanih uzoraka. U ispitivanim uzorcima lišajeva nije detektovano prisustvo As, Se, Be, Tl.

Frutikozni lišaj *E. prunastri*, koji raste na kori biljke domaćina, ima najmanji sadržaj 12 od 19 određivanih elemenata (K, Mg, Na, P, Al, Cu, Fe, Si, V, Zn, Cd i Pb). Ne postoji pravilnost u zastupljenosti elemenata u uzorcima folioznih lišajeva koji rastu na stenama (*U. crustulosa* i *U. cylindrica*) ili na kori biljke domaćina (*H. tubulosa*).

Poređenjem uzoraka *E. prunastri* sakupljenih na području Cerja i Donjeg Vlasa (ruralno stanište) sa uzorkom sakupljenim na Vlasinskoj visoravni (takođe ruralno stanište) uočava se da je sadržaj Co desetostruko veći, sadržaj Cu je 2 do 3 puta manji, Cr i Fe za

REZULTATI I DISKUSIJA

trećinu veći, a sadržaj Mn, Ni i Zn dva do tri puta veći. Sadržaj Ba je približno isti kao kod uzorka sa područja Cerja dok je u odnosu na uzorak sakupljen na području Donje Vlase približno 40 puta manji, dok je sadržaj Pb tri puta veći u uzorku sa Vlasinske visoravni u odnosu na uzorke sa područja Cerja i Donjeg Vlase. Iako se radi o ruralnim staništima vetar može transportovati čestice iz udaljenih izvora zagađivača kao što su izduvni gasovi motornih vozila sa okolnih saobraćajnica.

4.2.1. Antioksidativna aktivnost

Određivanje antioksidativne aktivnosti acetonskih ekstrakta ispitivanih lišajeva urađeno je određivanjem sadržaja ukupnih fenola (TPC), sposobnosti „hvatanja“ DPPH[•] i ABTS^{•+} radikala, primenom CUPRAC metode kao i određivanjem ukupnog redukcionog kapaciteta (TRP). Rezultati su prikazani u Tabeli 15 i na Slikama 34-37.

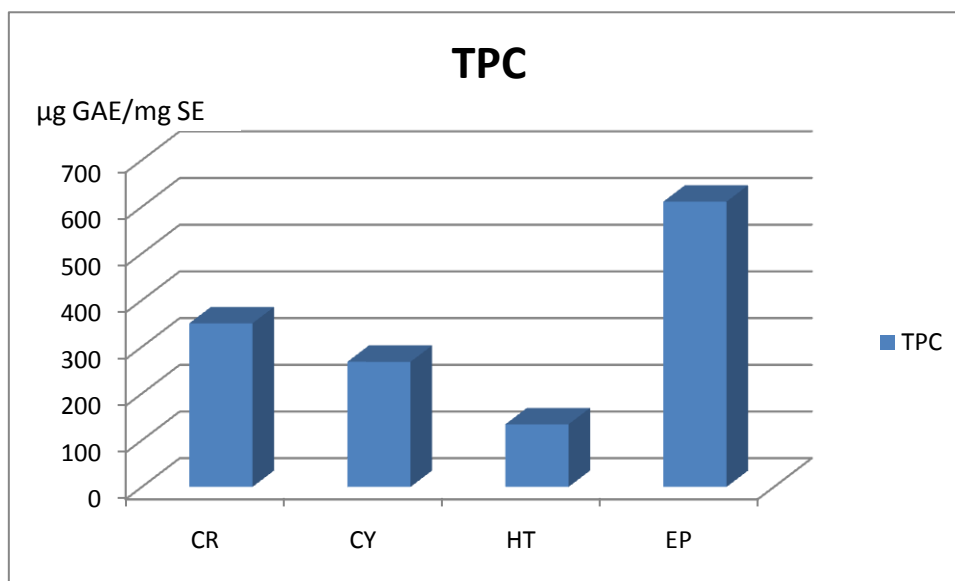
Tabela 15. Ukupni sadržaj fenola i antioksidativni kapacitet acetonskih ekstrakata lišajeva (srednja vrednost ± SD)

Uzorak	CR	CY	EP	HT
DPPH (%)	88,7± 1,22	77,0± 1,34	85,8± 0,91	93,5± 1,3
DPPH IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	8,46± 0,34	9,74± 0,21	8,74± 0,25	8,02± 0,32
ABTS (%)	96,2± 1,11	78,4± 1,34	91,2± 2,12	99,3± 1,89
ABTS IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	7,80± 0,44	9,57± 0,21	8,22± 0,55	7,55± 0,51
TRP (µg AAE mg ⁻¹)	0,6 ± 0,01	0,7 ± 0,02	0,6 ± 0,01	2,8 ± 0,01
CUPRAC (µg TE mg ⁻¹)	19,8 ± 0,12	21,9 ± 0,23	20,7 ± 0,51	46,5 ± 0,22
TPC (µg GAE mg ⁻¹)	350,4±14,63	267,9 ± 8,01	611,0 ± 6,32	134,1 ± 2,81

CR – *U. crustulosa*, CY- *U. cylindrica*, HT- *H. tubulosa*, EP- *E. prunastri*

Vrlo je teško porediti rezultate ispitivanja antioksidativne aktivnosti. Razlozi tome su brojni, a mogu se grupisati kao oni uslovljeni različitim metodologijim ispitivanja antioksidativnih karakteristika, i oni izazvani različitim načinom izražavanja rezultata. Vrlo često male promene u eksperimentalnim uslovima (koncentracije reagenasa, vreme trajanja reakcije, temperatura, korišćeni rastvarač, talasna dužina na kojoj se vrše snimanja) mogu da dovedu do značajne razlike u dobijenim rezultatima ispitivanja istog ekstrakta. Na antioksidativnu aktivnost ekstrakta značajno utiče i izbor rastvarača za ekstrakciju. Uzimajući u obzir navedeno, pokušali smo da rezultate dobijene u okviru ove disertacije uporedimo sa publikovanim rezultatima izraženim u istim jedinicama navodeći na koji ekstrakt se odnose.

REZULTATI I DISKUSIJA



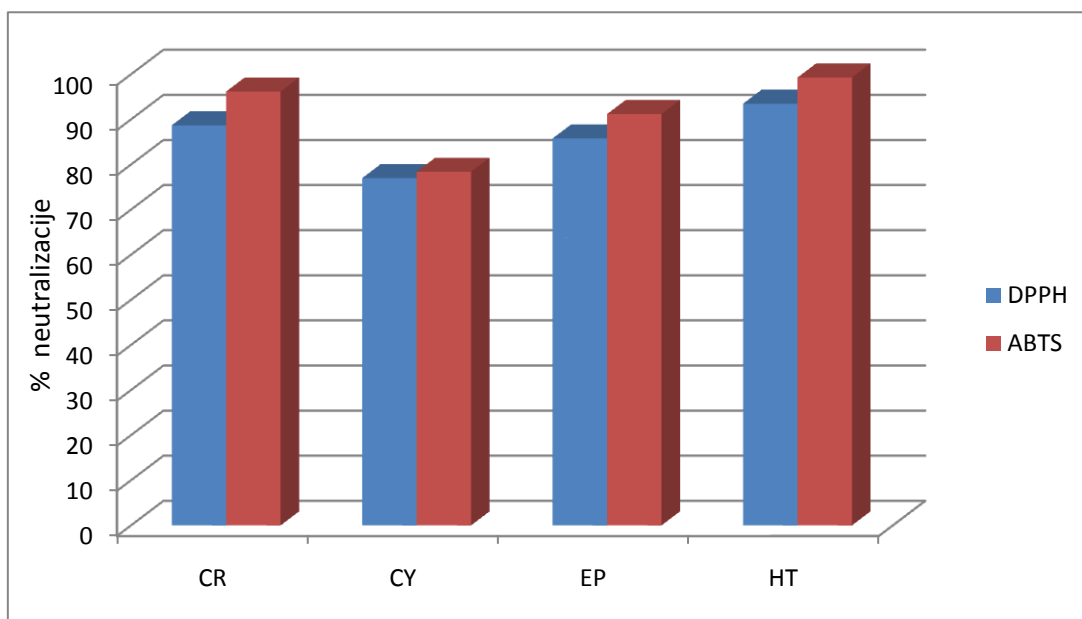
Slika 26. Sadržaj ukupnih fenola ($\mu\text{g GAE mg}^{-1}\text{ SE}$) acetonskih ekstrakata lišajeva *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT)

Najveći sadržaj ukupnih fenola pokazuje acetonski ekstrakt frutikoznog lišaja *E. prunastri* praćen acetonskim ekstraktima folioznih lišajeva *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, i *H. tubulosa* (Slika 26). Manojlović i saradnici (2012) su dobili manje vrednosti sadržaja ukupnih fenola i to $79,2 \pm 0,59 \text{ mg GAE g}^{-1}$ za metanolni i $71,32 \pm 0,87 \text{ mg GAE g}^{-1}$ za hloroformski ekstrakt u odnosu na naš acetonski ekstrakt. U slučaju acetonskog ekstrakta *E. prunastri* sadržaj ukupnih fenola je iznosio $611,0 \pm 6,3 \mu\text{g GAE mg}^{-1}\text{ SE}$. Dobijene vrednosti su veće u odnosu na one dobijene analizom metanolnih ekstrakata od strane Mitrović i saradnika (2011) ($80,73 \pm 1,25 \text{ mg GAE g}^{-1}$) kao i Stojanović i saradnika (2010) i ($18,24 \pm 0,27 \mu\text{g GAE mg}^{-1}$). Sadržaj fenolnih komponenti u acetonskom ekstraktu *H. tubulosa* bio je $134,1 \pm 2,8 \mu\text{g GAE mg}^{-1}\text{ SE}$. Dobijeni rezultati su poredivi sa rezultatima metanolnog ekstrakta *H. physodes* određenih u radu Mitrović i saradnici (2011) ($141,59 \pm 1,12 \text{ mg GAE g}^{-1}\text{ SE}$) ali su viši od rezultata određenih u radu Stojanovic i saradnika (2010), $17,45 \pm 0,21 \text{ mg GAE g}^{-1}\text{ SE}$.

Ne postoji značajna razlika u procentu aktivnosti prema DPPH i ABTS radikalima ispitivanih ekstrakata (Slika 27).

Acetonski ekstrakt *U. crustulosa* u koncentraciji od 15 mg mL^{-1} smanjuje aktivnost DPPH i ABTS radikala za 88,7% i 96,2%, redom. Kosanić i saradnici (2014) su našli da je aktivnost metanolnog ekstrakta *U. crustulosa* u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} iznosila 79,85 %.

REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 27. Procenat neutralizacije DPPH i ABTS radikala acetonskim ekstraktima lišajeva *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT) u koncentraciji od 15 mg mL⁻¹

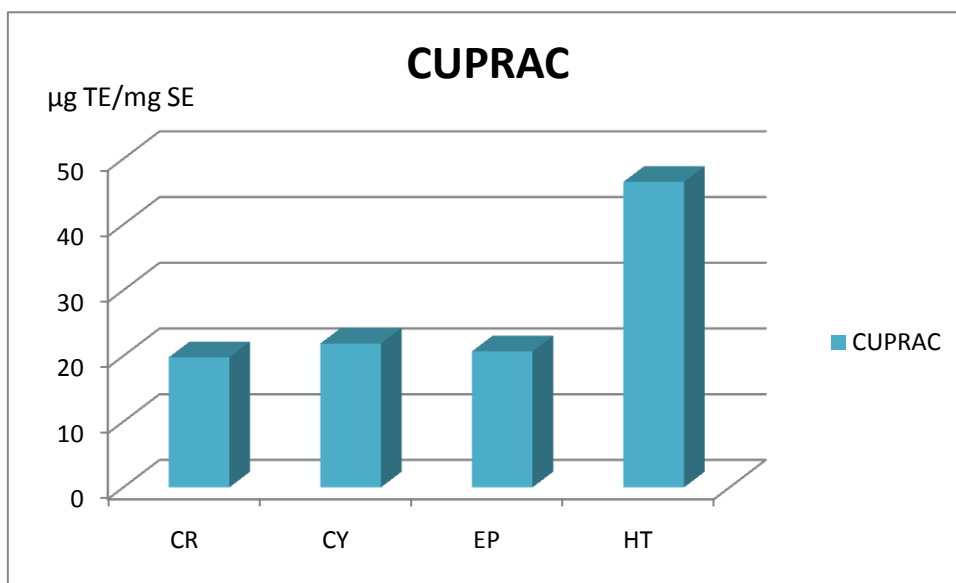
Manojlović i saradnici (2011) su publikovali IC₅₀ vrednosti prema DPPH radikalu od 34,45±1,15 µg mL⁻¹ za metanolni i 31,34±1,10 µg mL⁻¹ za hloroformski ekstrakt.

Ekstrakt *H. tubulosa* redukuje koncentraciju DPPH i ABTS radikala za 93,5% i 99,3%.

Sposobnost hvatanja DPPH i ABTS radikala ekstrakta *E. prunastri* iznosi 85,8% i 91,2%, (redom) dok su IC₅₀ vrednosti 8,74 mg mL⁻¹ za DPPH i 8,22 mg mL⁻¹ za ABTS. Kosanić i saradnici (2013) su dobili IC₅₀ vrednosti za DPPH radikalu za acetonski ekstrakt *E. prunastri* 663,12 µg mL⁻¹. Mitrović i saradnici (2011) su dobili vrednosti veće od 1000,00 µg mL⁻¹ za DPPH aktivnost metanolnog ekstrakta *E. prunastri*, dok su Stojanović i saradnici (2010), takodje za metanolni ekstrakt odredili vrednost od 727,7±0,60 µg mL⁻¹.

Rezultati dobijeni primenom CUPRAC metode prikazani su na Slici 28, sa koje se uočava da ekstrakt *H. tubulosa* pokazuje približno dvostruko veću aktivnost u odnosu na ostale ekstrakte. Aktivnost acetonskih ekstrakata po ovoj metodi opada u nizu: *H. tubulosa*, *U. cylindrica*, *U. crustulosa*, *E. prunastri*

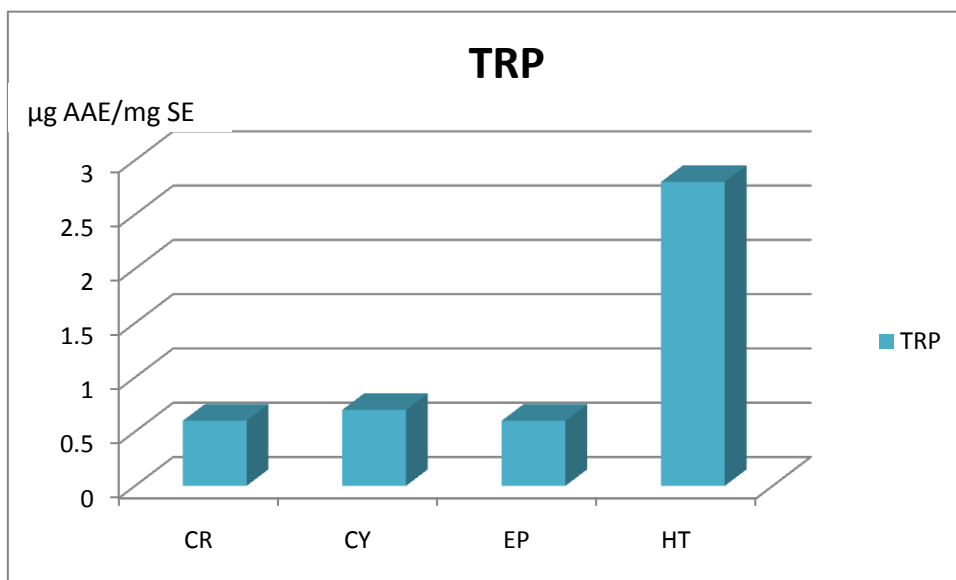
REZULTATI I DISKUSIJA



Slika 28. Sposobnost redukcije Cu (II) do Cu (I) acetonskih ekstrakata lišajeva *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT)

U literature ne postoje podaci o antioksidativnoj aktivnosti ispitivanih lišajeva CUPRAC metodom.

Najveću vrednost ukupne redukcionne moći, izražene kao ekvivalent askorbinske kiseline, pokazao je ekstrakt *H. tubulosa* (približno četiri puta veću u odnosu na ostale ekstrakte).



Slika 29. Ukupna redukciona moć acetonskih ekstrakata lišajeva *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrica* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT)

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati određivanja ukupne redukcijske moći za metanolni ekstrakt *E. prunastri* su za iznosili $35,5 \pm 0,2 \mu\text{g AAE mg}^{-1} \text{ SE}$ (Stojanovic i saradnici, 2010).

Veći kapacitet u odnosu na ostale ekstrakte ispoljava acetonski ekstrakt *H. tubulosa* za DPPH, ABTS, TRP i CUPRAC testove (Slika 27, 28, 29) uprkos tome što ima najmanji sadržaj ukupnih fenola što je različito od ranije objavljenih rezultata (Giovanna Piluzza i Simonetta Bullitta, 2011).

4.2.2. Antibakterijska aktivnost

Rezultati antibakterijske aktivnosti na dve Gram-pozitivne (*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) i tri Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella abony* NCTC 6017) za ispitivane acetonske ekstrakte dati su u Tabeli 16. Analiza pokazuje da acetonski ekstrakt *U. crustulosa* ne ispoljava aktivnost na testirane bakterije u koncentraciji od 1 mg po disku. Ovi rezultati nisu u potpunosti u skladu sa prethodno objavljenim. Ranković i saradnici (2009) i Kosanić i saradnici (2014) su ustanovili da acetonski i metanolni ekstrakti *U. crustulosa* ne pokazuju aktivnosti na *Escherichia coli*, *Botrytis cinerea* i *Candida albicans* ali pokazuju umerenu aktivnost na nekoliko bakterija i gljivica kao što su: *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma harzianum*. Bacukoglu i saradnici (2013) kao i Candan i saradnici (2006) su naveli da giroforna kiselina izolovana iz nekih vrsta roda *Umbilicaria* ne pokazuje aktivnost na *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella typhimurium*. Pošto giroforna kiselina čini 68,5% ispitivanog acetonskog ekstrakta *U. crustulosa* rezultati antibakterijske aktivnosti mogu se objasniti upravo njenom neaktivnošću na ove bakterije.

Acetonski ekstrakt *U. cylindrica* pokazuje umerenu antibakterijsku aktivnost na Gram-pozitivne bakterije, pri čemu je veća zona inhibicije zabeležena kod *S. aureus* (19 mm) od zone inhibicije kod *B. spizizenii* (14 mm). Ekstrakt nije pokazao dejstvo na Gram-negativne bakterije. Manojlović i saradnici (2012) su ispitivali aktivnost metanolnog i etil-acetatnog ekstrakta *U. cylindrica* i pokazali da ekstrakti poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost na mikroorganizme: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

REZULTATI I DISKUSIJA

Acetonski ekstrakt *H. tubulosa* poseduje umerenu aktivnost na Gram-pozitivne bakterije, zona inhibicije kod *S. aureus* je 28 mm a kod *B. spizizeni* 20 mm. Ekstrakt nije pokazao aktivnost na Gram-negativne bakterije u koncentraciji od 1 mg po disku. Ovi rezultati nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima objavljenim od strane Yilmaz-a i saradnika (2005). Naime, Yilmaz i saradnici (2005) su pokazali da acetonski ekstrakt *H. tubulosa* poseduje umerenu mikrobiocidnu aktivnost na *E. coli* (530 µg po disku) i jaku aktivnost na *S. aureus* (66,3 µg po disku). Kvantitativni sastav ekstrakta nije naveden u datom radu.

Rezultati antimikrobne analize acetonskog ekstrakta *E. prunastri* pokazuju da maksimalna zona inhibicije iznosi 25 mm za *B. spizizeni*. Nešto slabija antibakterijska aktivnost zabeležena je protiv druge Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* i iznosi 20 mm. Gram negativne bakterije (*E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. abony*) su kao i u prethodnim eksperimentima bile rezistentne. Rezultati Kosanića i saradnika (2014) pokazuju da acetonski ekstrakt *E. prunastri* i izolovana evernična kiselina imaju značajnu antimikrobnu aktivnost protiv testiranih bakterija (*Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum*). Mitrović i saradnici (2011) su zabeležili jaku antifugalnu aktivnost metanolnog ekstrakta *E. prunastri* i značajnu antibakterijsku aktivnost na bakterije: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia. coli*, *Pseudomaonas. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhymirium*, *Salmonella enterica*.

Kao pozitivne kontrole, korišćeni su antibiotici hloramfenikol i streptomycin. Antibiotici pokazuju sličan ukupni prečnik baktericidne aktivnosti na Gram-pozitivne bakterije kao i ekstrakti ali pri znatno nižoj koncentraciji (33 puta i 100 puta manja, redom) i manjem prečniku diska. Kao negativna kontrola korišćen je rastvarač, u ovom slučaju aceton, koji nije pokazao antibakterijsku aktivnost.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 16. Baktericidna aktivnost (mm, srednja vrednost \pm SD) acetonskih ekstrakata ispitivanih lišajeva (1 mg po disku, prečnik diska 12,7 mm) i antibiotika (streptomycin, 10 μ g po disku prečnika 6 mm; i hloramfenikol, 30 μ g po disku prečnika 6 mm)

Uzorci	Prečnik baktericidne zone u mm (srednja vrednost \pm SD)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis ssp. spizizeni</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. abony</i>	<i>S. aureus</i>
<i>U. crustulosa</i>	-	-	-	-	-
<i>U. cylindrica</i>	-	14 \pm 0,3	-	-	19 \pm 0,2
<i>H. tubulosa</i>	-	20 \pm 0,2	-	-	28 \pm 0,1
<i>E. prunasrti</i>	-	25 \pm 0,3	-	-	20 \pm 0,2
Hloramfenikol	22 \pm 0,1	32 \pm 0,3	17 \pm 0,2	28 \pm 0,1	29 \pm 0,3
Streptomycin	13 \pm 0,2	22 \pm 0,3	18 \pm 0,1	16 \pm 0,3	20 \pm 0,2
Aceton	-	-	-	-	-

- nema aktivnosti

4.2.3. Mikronukleusni test

Uticaj ekstrakata na aberaciju hromozoma u perifernim humanim limfocitima ispitivan je mikronukleusnim testom u koncentracijama od 1,0; 2,0 i 3,0 μ g mL⁻¹. Određena je učestalost i raspodela mikronukleusa u humanim limfocitima. Statistički značajna razlika između parova je procenjena analizom varijacije (Oneway ANOVA) praćena Tukey testom. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 17 i na histogramu (Slika 30).

Tretiranje ćelija sa mitomicinom C (negativna kontrola) u koncentraciji od 0,1 μ g mL⁻¹ dovodi do značajnog povećanja broja mikronukleusa od 27% u poredjenju sa kontrolnom grupom. U ćelijskim kulturama tretiranim radioprotektantom amifostinom WR-2721 u koncentraciji od 1 μ g mL⁻¹ dolazi do smanjenja broja mikronukleusa od 11,4% u poredjenju sa kontrolnim ćelijskim kulturama. Acetonski ekstrakt *U. crustulosa* u koncentraciji od 2 μ g mL⁻¹ dovodi do smanjenja broja mikronukleusa od 16,4% što je vrednost veća od smanjenja broja mikronukleusa izazvanih amifostinom (11,4%), dok u koncentraciji od 1 μ g mL⁻¹ pokazuje nešto slabiju aktivnost od amifostina (10,8%). Ekstrakt *U. crustulosa* u koncentraciji od 3 μ g mL⁻¹ pokazuje manju aktivnost od amifostina (6,2%). Kako broj mikronukleusa služi kao indikator DNK oštećenja, rezultati ukazuju da ispitivani ekstrakti u koncentraciji od 2 μ g mL⁻¹ pokazuju protektivni efekat na DNK.

REZULTATI I DISKUSIJA

Ekstrakt *H. tubulosa* u koncentraciji od 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ izaziva smanjenje učestalosti mikronukleusa za 4,2% dok pri višim koncentracijama (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) dovodi do povećanja od 7,2% u poređenju sa kontrolnim ćelijskim kulturama. Prethodna ispitivanja *H. physodes* ekstrakta pokazuju slične rezultate. Tretiranje ćelijskih kultura sa acetonskim ekstraktom *H. physodes* u koncentraciji od 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuje smanjenje učestalosti mikronukleusa od 5,4% dok u koncentraciji od 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ izaziva povećanje od 3,3%. Fizodalična kiselina, fizodična kiselina, 3-hidroksifizodična kiselina i atranorin u koncentraciji od 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pokazuju izraženi efekat na smanjenje učestalosti mikronukleusa za 22,0%; 28,2%; 30,3% i 21,6%, redom (Stojanovic i saradnici, 2013).

Ekstrakt lišaja *E. prunastri* je pokazao najveću aktivnost pri koncentraciji od 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (10,3%) dok u koncentraciji od 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ izazivaju manje smanjenje učestalosti mikronukleusa u odnosu na kontrolni uzorak (5,7% i 4,9%, redom). U prethodnim ispitivanjima je pokazano da komponente acetonskog ekstrakta *E. prunastri* pokazuju značajano smanjenje broja mikronukleusa, usninska kiselina 48,9%, evernična kiselina 32,9% dok je atranorin pokazao najslabiju aktivnost od 11,1% (Stojanović i saradnici, 2013).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 17. Učestalost mikronukleusa, citokinezis blok proliferacioni indeks i distribucija mikronukleusa po ćeliji tretiranih različitim koncentracijama ekstrakata lišajeva

Uzorak (koncentracija $\mu\text{g mL}^{-1}$)	MN/1000 Bn ćelija	Bn ćelije sa MN (%)	MN/Bn ćelije	CBPI	Učestalost MN (%)
Kontrola	25,83±0,58	2,06±0,12	1,25±0,06	1,63±0,03	100,0
Amifostin 1	22,89±0,68 a*	1,87±0,06	1,22±0,06	1,62±0,04	88,6
MMC (0,1)	33,4 ± 1,82 a,b*	2,99 ± 0,17	1,15 ± 0,04	1,71 ± 0,07	127,0
CR (1,0)	23,05±1,06	1,89±0,08	1,22±0,06	1,68±0,06	89,2
CR (2,0)	21,60±1,68	1,62±0,13	1,34±0,13	1,63±0,01	83,6
CR (3,0)	24,24±1,21	2,06±0,12	1,18±0,04	1,63±0,02	93,8
CY (1,0)	24,46±0,99	1,96±0,14	1,25±0,06	1,66±0,01	94,7
CY (2,0)	22,98±1,27	1,79±0,13	1,30±0,09	2,03±0,31	89,0
CY (3,0)	25,42±2,11	1,89±0,31	1,40±0,12	1,68±0,06	98,4
HT (1,0)	26,4 ± 0,75 b,c	2,03 ± 0,20	1,32 ± 0,14	1,60 ± 0,01	100,4
HT (2,0)	25,2 ± 1,01 c*	2,09 ± 0,09	1,20 ± 0,04	1,62 ± 0,02	95,8
HT (3,0)	28,2 ± 1,54	2,39 ± 0,21	1,90 ± 0,05	1,73 ± 0,04	107,2
EP (1,0)	24,8 ± 0,70 c*	2,07 ± 0,06	1,20 ± 0,05	1,66 ± 0,01	94,3
EP (2,0)	23,6 ± 1,08 a, c*	1,63 ± 0,15	1,39 ± 0,08	2,04 ± 0,31	89,7
EP (3,0)	25,0 ± 1,71	1,87 ± 0,30	1,39 ± 0,13	1,66 ± 0,04	95,1

U. crustulosa (CR), *U. cylindrica* (CY), *H. tubulosa* (HT) i *E. prunastri* (EP), MMC-mitomycin C

MN/1000 Bn ćelija → broj mikronukleusa na 1000 pregledanih binuklearnih ćelija, (srednja vrednost±SD)

Bn ćelije → binuklearne ćelije sa mikronukleusom, (srednja vrednost±SD)

MN/Bn ćelija → broj mikronukleusa/ binuklearnoj ćeliji

CBPI → citokinezis blok proliferacioni indeks

Učestalost MN → učestalost mikronukleusa predstavljena kao % u odnosu na kontrolne grupe u kulturi humanih limfocita tretiranih različitim koncentracijom ekstrakata

Statistički značajna razlika između parova podataka je procenjena analizom varijance (One-way ANOVA) praćena korišćenjem Tukey testa. Statistička razlika je smatrana značajnom pri $p < 0,01$.

a → statistički značajna razlika $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu

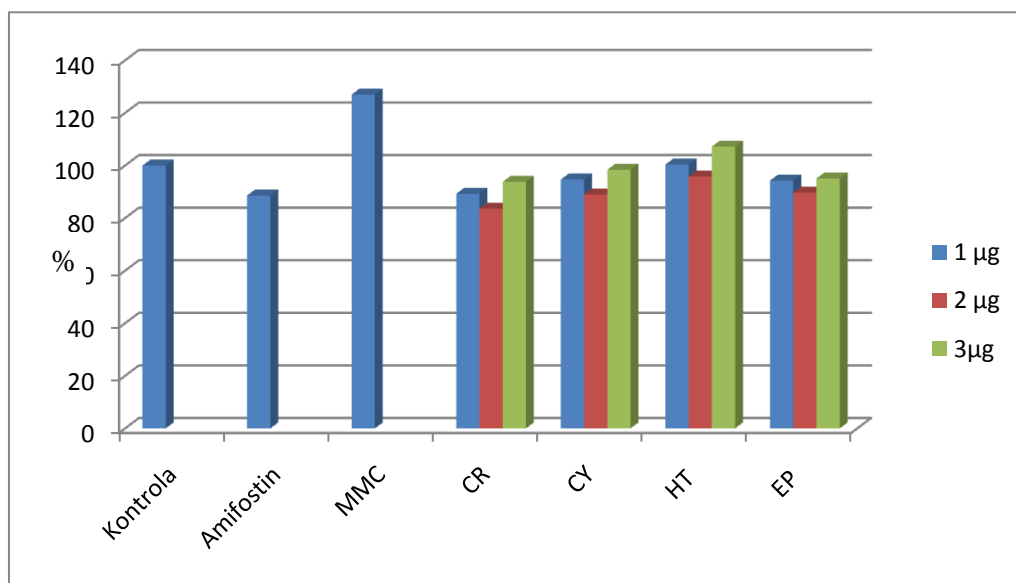
a* → statistički značajna razlika $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu

b → statistički značajna razlika $p < 0,01$ u odnosu na amifostin

b* → statistički značajna razlika $p < 0,05$ u odnosu na amifostin

c → statistički značajna razlika $p < 0,01$ u odnosu na mitomicin

REZULTATI I DISKUSIJA



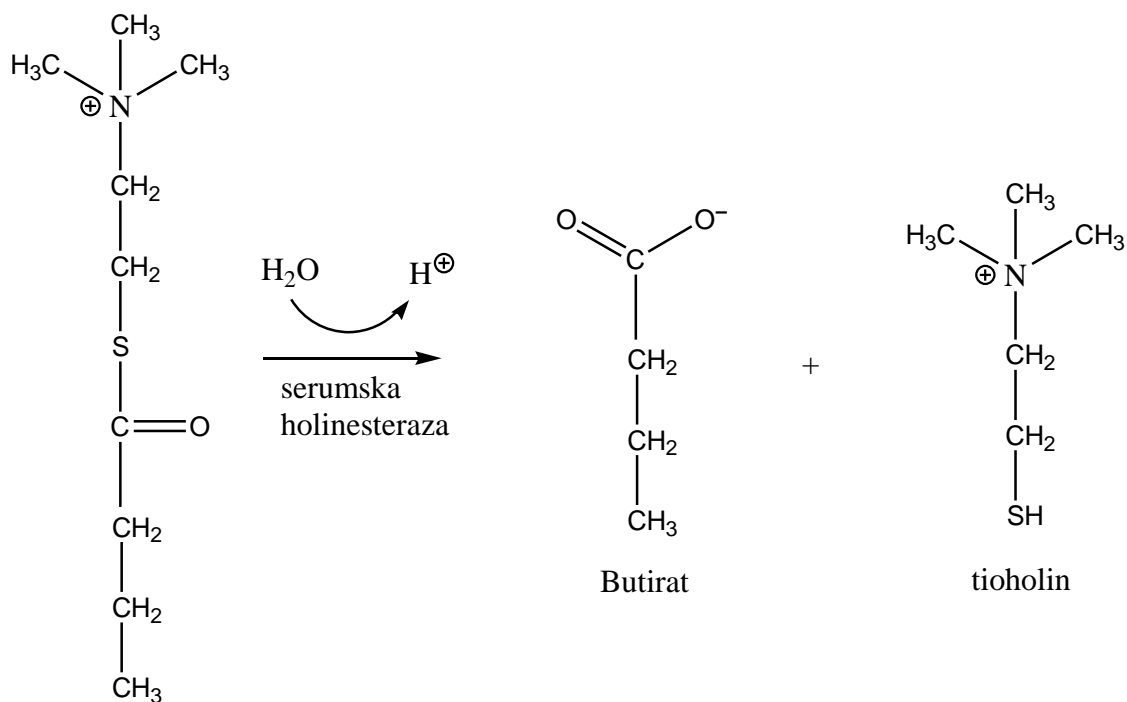
Slika 30. Uticaj acetonskih ekstrakata lišajeva *U. crustulosa* (CR), *U. cylindrical* (CY), *E. prunastri* (EP) i *H. tubulosa* (HT) na učestalost mikronukleusa (%)

Dejstvo ispitivanih ekstrakata na ćelijsku proliferaciju je ispitivano određivanjem proliferacijskog indeksa (CBPI), koji se računa kao $[(MI + 2MII + 3(MIII + MIV)]/N$, gde M I–IV predstavlja broj ćelija sa 1 do 4 jedara, redom a N je ukupan broj izbrojanih ćelija. Uporedive vrednosti CBPI za ekstrakte, amifostin WR-2721 i kontrolne ćelije potvrđuju da uzorci nemaju uticaja na proliferaciju ćelija. Ova činjenica je važna za validnost rezultata jer mikronukleusna ekspresija zavisi od ćelijske podele.

4.2.4. Uticaj acetonskih ekstrakata i giroforne kiseline na aktivnost holinesteraze

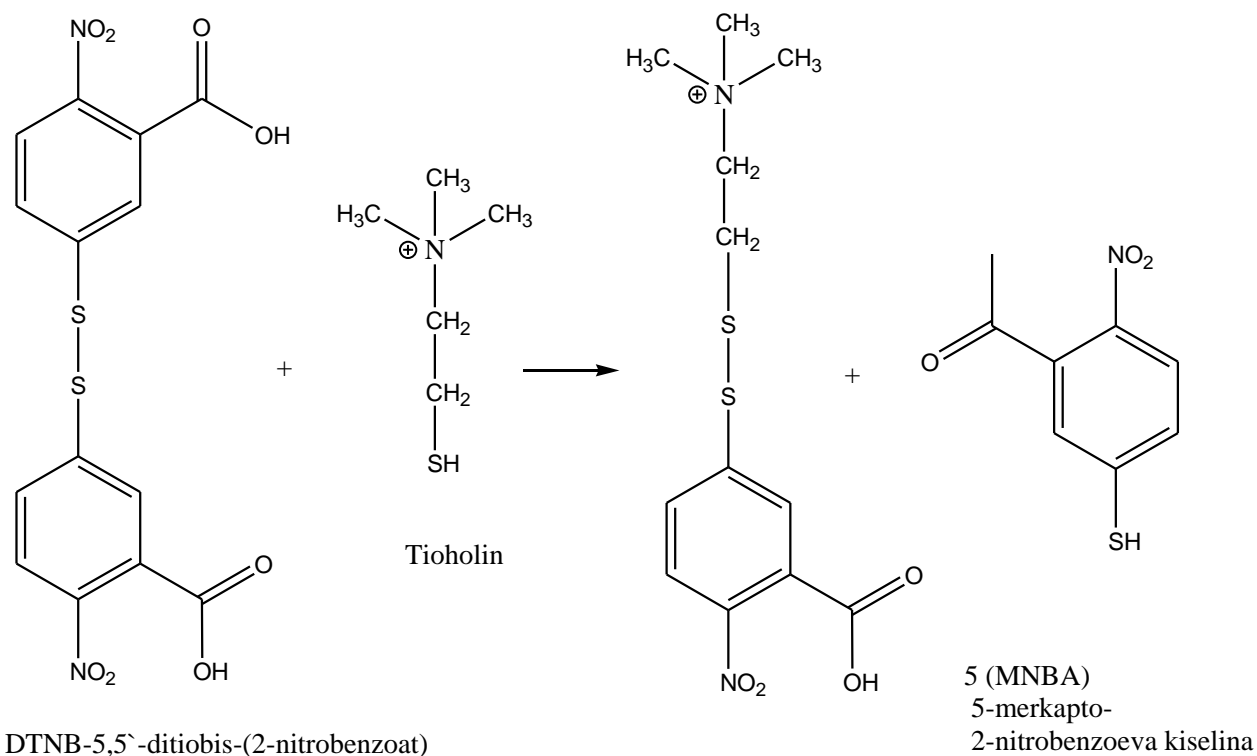
Aktivnost holinesteraze je određena Elmanovom metodom koja se zasniva na sledećim reakcijama: serumska holinesteraza katalizuje hidrolizu butiriltioholina (BuTC) do butirata i tioholina (Slika 31) koji koji reaguje sa 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat) (DTNB) gradeći žuto obojen kompleks 5-tio-2-nitrobenzoat (Slika 32).

REZULTATI I DISKUSIJA



Butiriltioholin

Slika 31. Hidroliza butiriltioholina serumskom holinesterazom



Slika 32. Indikatorska reakcija određivanja aktivnosti holinesteraze sa 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoat)om (DTNB)

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati dobijeni praćenjem interakcije ekstrakta i izolovane giroforne kiseline sa holinesterazom iz humanog seruma su dati u Tabeli 18.

Tabela 18. Uticaj acetonskih ekstrakata lišaja *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *H. tubulosa* i *E. prunastri* i izolovane giroforne kiseline na aktivnost holinesteraze

Uzorak	Koncentracija (mg mL ⁻¹)	% aktivacije ili inhibicije
Neostigmin bromid	0,2	-96,6
<i>U. crustulosa</i>	10	+1,6
<i>U. cylindrica</i>	10	+4,4
<i>H. tubulosa</i>	10	-26,6
<i>E. prunastri</i>	10	-22,8
Giroforna kiselina	10	-18,4

Acetonski ekstrakti lišaja *U. crustulosa* i *U. cylindrica* u koncentraciji od 10 mg mL⁻¹ pokazuju slab aktivacioni efekat na aktivnost holinesteraze (1,6% i 4,4%, redom) dok acetonski ekstrakti *E. prunastri* i *H. tubulosa* pokazuju inhibirajući efekat od 22,2% i 26,6% (redom). Izolovana giroforna kiselina, takođe, pokazuje inhibirajuće dejstvo. Ipak, sva ispoljena inhibirajuća dejstva su daleko ispod inhibirajućeg dejstva standardnog inhibitora holinesteraze, neostigmin-bromida (Tabela 16).

5. ZAKLJUČAK

Za lišajeve *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *H. tubulosa* i *E. prunastri* određen je: hemijski sastav acetonskih, etarskih, etil-acetatnih i dihlormetanskih ekstrakata; sadržaj makro i mikro elemenata sušenog lišajevskog materijala; antioksidativni kapacitet acetonskih ekstrakata; antibakterijska aktivnost acetonskih ekstrakata; uticaj acetonskih ekstrakata na formiranje mikronukleusa u limfocitima humane krvne plazme i uticaj acetonskih ekstrakata na aktivnost serumske holinesteraze čime je ostvaren cilj doktorske disertacije "Hemijski sastav, antibakterijska, antioksidativna i genotoksična aktivnost lišajeva *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise, *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. i *Evernia prunastri* (L.) Ach." Dodatno, određen je sadržaj radionuklida za lišaj *E. prunastri*.

Dobijeni su sledeći rezultati:

- Giroforna kiselina je najzastupljenija komponenta acetonskog, etarskog i etil-acetatnog ekstrakata lišaja *U. crustulosa* praćena lekanornom kiselinom i krustinskom kiselinom. Ispitivani uzorak *U. crustulosa* pripada girofornom hemotipu.
- Giroforna kiselina je najzastupljenije jedinjenje i u acetonskom ekstraktu *U. cylindrica*. U slučaju etarskog i etil-acetatnog ekstrakta najzastupljenija je norstiktik kiselina.
- Glavne komponente acetonskog, etarskog i etil-acetatnog ekstrakta lišaja *H. tubulosa* su fizodična kiselina i 3-hidroksifizodična kiselina praćene fizodaličnom, 4-O-metilfizodičnom kiselinom i atranorinom.
- Najzastupljenija komponenta acetonskog ekstrakta lišaja *E. prunastri* je evernična kiselina praćena atranorinom, dok je u slučaju etarskog i etil-acetatnog ekstrakta obrnuta zastupljenost.
- Sastav dihlormetanskih ekstrakata svih ispitivanih lišajeva je različit od ostalih ekstrakata pri čemu je dominantna komponenta atranorin a depsidi i depsidoni su zastupljeni u manjem procentu.
- Intenzitet signala na HPLC hromatogramima ekstrakata svih ispitivanih lišajeva opada u nizu: acetonski, etil-acetatni, etarski i dihlormetanski.

ZAKLJUČAK

- Orcinol i orselinska kiselina su najzastupljenije isparljive komponente u etarskom i etil-acetatnom ekstraktu lišaja *U. crustulosa*.
- Etraski i etil-acetatni ekstrakti *U. cylindrica* se odlikuju prisustvom orcinola i atrarične kiseline kao najzastupljenijim komponentama.
- U dihlormetanskim ekstraktima *U. crustulosa* i *U. cylindrica* najzastupljeniji su steroli.
- U ispitivanim ekstraktima *H. tubulosa* najzastupljenije isparljive komponente su olivetol, 3-hidroksiolivetonid i olivetonid.
- Glavna komponenta dihlormetanskog ekstrakta je atrarična kiselina praćena atranolom i hloratranolom.
- Atrarična kiselina je glavna komponenta ekstrakata lišaja *E. prunastri*.
- Najveći sadržaj sterola je zapažen kod ekstrakata *U. crustulosa* i *U. cylindrica* koji rastu na steni dok kod vrsta sakupljenih na drvetu (*E. prunastri* i *H. tubulosa*) steroli nisu detektovani što ukazuje da su steroli sekundarni metaboliti lišajeva i nisu dospeli u lišaj migracijom sa drveta domaćina.
- NMR analizom acetonskog, metanolnog i etanolnog ekstrakta lišaja *U. crustulosa* ustanovljeno je prisustvo metil-grupe na 3,9 ppm-a u svim ekstraktima što je potvrda da su metil-estri integralne komponente ekstrakta i da ne nastaju u procesu ekstrakcije metanolom.
- Sadržaj Ca, Na i P je najveći u uzorku *H. tubulosa*; sadržaj K u uzorku *U. crustulosa*; sadržaj Mg u uzorku *U. cylindrica*.
- Lišaj *U. cylindrica* ima najveći sadržaj mikroelemenata Al, Co, Cr, Fe, Mn, V, Ba, Cd i Pb dok je sadržaj B, Si i Zn najveći u lišaju *U. crustulosa* a Ni u *H. tubulosa*.
- Ispitivani uzorci lišajeva nisu sadržali As, Se, Be, Tl.
- Frutikozni lišaj *E. prunastri*, koji raste na kori biljke domaćina, ima najmanji sadržaj 12 od 19 određivanih elemenata (K, Mg, Na, P, Al, Cu, Fe, Si, V, Zn, Cd i Pb). Ne postoji pravilnost za zastupljenost elemenata u uzorcima folioznih lišajeva koji rastu na stenama (*U. crustulosa* i *U. cylindrica*) ili na kori biljke domaćina (*H. tubulosa*).

ZAKLJUČAK

- Specifična aktivnost ^{40}K je iznosila 108 Bq kg^{-1} što je u skladu sa ranije objavljenim rezultatima dok su aktivnosti ^{137}Cs , ^{226}Ra i ^{232}Th ispod granica detekcije koje iznose 3 Bq kg^{-1} za ^{137}Cs , 20 Bq kg^{-1} za ^{226}Ra i 15 Bq kg^{-1} za ^{232}Th .
- Najveću sposobnost neutralizacije DPPH i ABTS radikala ima acetonski ekstrakt *H. tubulosa*, praćen ekstraktima *U. crustulosa*, *U. cylindrica* i *E. prunastri*.
- Ukupni sadržaj fenola raste u nizu *U. cylindrica*, *H. tubulosa*, *U. crustulosa* i *E. prunastri*.
- Sposobnost redukcije Fe (III) do Fe (II) kao i Cu (II) do Cu (I) opada u nizu *H. tubulosa*, *U. cylindrica*, *U. crustulosa*, *E. prunastri*.
- Rezultati antioksidativne aktivnosti ukazuju na veći antioksidativni kapacitet depsidona u odnosu na depside s obzirom na to da su depsidoni glavni sastojci acetonskog ekstrakta *H. tubulosa* za razliku od acetonskog ekstrakta ostalih lišajeva u kojima dominiraju depsidi.
- Antibakterijska aktivnost je ispitivana na dve Gram-pozitivne (*Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* ATCC 6633 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) i tri Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 i *Salmonella abony* NCTC 6017) u koncentraciji od 1 mg acetonskog ekstrakta po disku. Ekstrakt *U. crustulosa* ne ispoljava aktivnost na testirane bakterije. Gram-negativne bakterije su rezistentne na ispitivane ekstrakte. Ekstrakti *U. cylindrica* i *H. tubulosa* pokazuju umerenu baktericidnu aktivnost na Gram-pozitivne bakterije, pri čemu je veća baktericidna zona zabeležena za *S. aureus* od baktericidne zone za *B. spizizenii* dok ekstrakt *E. prunastri* ispoljava jaču aktivnost na *B. spizizenii* u odnosu na *S. aureus*.
- Uticaj acetonskih ekstrakata na učestalost mikronukleusa u ćelijama humanih limfocita je ispitivan u koncentracijama od 1 mg mL^{-1} , 2 mg mL^{-1} i 3 mg mL^{-1} . Najveće smanjenje učestalosti pokazuju ekstrakti u koncentraciji od 2 mg mL^{-1} , pri čemu ekstrakt *U. crustulosa* pokazuje aktivnost veću od radioprotektanta amifostina.
- Iako ekstrakti *H. tubulosa*, *E. prunastri* i giroforne kiseline u koncentraciji od 10 mg mL^{-1} pokazuju inhibirajući efekat na aktivnost holinesteraze taj efekat je približno petostruko manji od inhibitornog efekta neostigmin-bromida.

ZAKLJUČAK

Prema našim saznanjima za acetonске екстракте лишajeva *U. crustulosa*, *U. cylindrica*, *E. prunastri* i *H. tubulosa* po prvi put je određen njihov uticaj na dejstvo holinesteraze, na učestalost mikronukleusa u ćelijama humanih limfocita kao i antioksidativna aktivnost CUPRAC metodom. Takođe je po prvi put određen sastav acetonskog, etarskog, etil-acetatnog i dihlormetanskog ekstrakta лишaja *H. tubulosa* i makro i mikro elementi za лишajeve *U. crustulosa*, *U. cylindrica* i *H. tubulosa*.

6. LITERATURA

1. Ahmadian V. (1993). *The lichen symbiosis*, New York: John Wiley and sons.
2. Adams RP. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
3. Apak R, Guçlu K, Ozyurek M, Oglu BB, Bener M. (2008). Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for food antioxidants: Vitamins, polyphenolics, and flavonoids in food extracts. *Methods in Molecular Biology*, 477:163–93.
4. Buçukoglu ZT, Albayrak S, Halici G, Tay Y. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of extracts and lichen acids obtained from some *Umbilicaria* species from central Anatolia Turkey. *Journal of food processing and preservation*, 37: 1103–1110.
5. Bosch-Roig P, Barca D, Crisci GM, Lalli C. (2013). Lichens as bioindicators of atmospheric heavy metal deposition in Valencia, Spain, *Journal of Atmospheric Chemistry*, 70 (4): 373–388.
6. Bargagli, R. (2000). Trace metals in Antarctica related to climate change and increasing human impact. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 166: 129-174.
7. Candan M, Yilmaz M, Tay T, Kivanç M, Turk H. (2006). Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its Gyrophoric and Stenosporic acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C Journal of Biosciences*, 61: 319-323.
8. Camelo MR, Kehdy SGF, Salas EC, Lopes TPM. (2008). Amifostine Protection Against Mitomycin-induced Chromosomal Breakage in Fanconi Anaemia Lymphocytes. *Molecules*, 13: 1759-1772.
9. Culberson C. (1963). The lichen substances of the genus *Evernia*. *Phytochemistry*. 2 (4): 335-340.
10. Culberson CF, Elix JA. (1989). Lichen substances. *Methods in Plant Biochemistry* 1: 509–532.
11. Čučulović A, Popovic D, Čučulović R, Ajtic J. (2012). Natural radionucleides and ¹³⁷Cs in moss and lichen in eastern Serbia. *Nuclear Technology and Radiation Protection* 27(1): 44-51.

L I T E R A T U R A

12. Countryman PI, Heddle JA. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41: 321–332.
13. Dragovic S, Jankovic Mandic Lj. (2010). Transfer of radionuclides to ants, mosses and lichens in semi-natural ecosystems, *Radiation and Environmental Biophysics* 49: 625–634.
14. Elix JA. (1996). *Biochemistry and secondary metabolites* In: TH Nash (Ed). *Lichen Biology* (154-180). Cambridge: Cambridge University Press.
15. Elix, JA, Norfolk, S. (1975). Synthesis of meta-divarinol and olivetol depsides. *Australian Journal of Chemistry*, 28(2): 399-411.
16. Elix JA, Gaul KL. (1986). The interconversion of the lichen depsides para-and meta-scrobiculin, and the biosynthetic implications. *Australian Journal of Chemistry* 39: 613-624.
17. Fujikawa F, Hirayama T, Nakamura Y, Suzuki M, Doi M, Niki C. (1970). Studies on antispetics for foodstuff. LXXI. Studies on orsellinic acid ester, beta-orcinolcarboxylic acid ester and olivetonide as a preservative for sake. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 90 (12): 1517.
18. Fernandez E, Reyes A, Hidalgo M E, Quilhot W. (1998). Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42 (3): 195-201.
19. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455: 81–95.
20. Fenech M, Denham J, Francis W, Morley A. (1990). Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology*, 57(2): 373-83.
21. Fenech M, Morley AA. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutation Research*, 285: 35-44.
22. Gonzales AG, Barrera JB, Marante FJT, Castellano AG. (2002). Bioactivity of natural products. Ethnobotany in AP Rauter, FB Palma, J Justino, ME Araujo, S Pina dos Santos, (Eds.) *Natural products in the New Millennium: prospects and industrial application* (195-210). Dodrecht, Netherlands: Kluwer Academic publishers

L I T E R A T U R A

23. Gođevac D, Tešević V, Vajs V, Milosavljević S, Stanković M. (2011). Blackberry seed extracts and isolated polyphenolic compounds showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Journal of Food Science*, 76: 1039-1043
24. Huneck S. (1991). New results in the chemistry of lichens. *Symbiosis*.
25. Huneck S, (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86 (12), 559-570.
26. Huneck S, Yoshimura I. (1996). *Identification of Lichen Substances*, Berlin: Springer-Verlag.
27. Heddle, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 18 (2): 187-190.
28. Hawksworth DL, McManus PM. (1989). Lichen recolonization in London under conditions of rapidly falling sulphur dioxide levels, and the concept of zone skipping. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 100: 99-109.
29. Hidalgo ME, Fernandez E, Quilhot W, Lissi E, (1994). Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry*, 37 (6): 1585-1587.
30. Honegger R. (1998). The Lichen Symbiosis—What is so Spectacular about it? *The Lichenologist*, 30 (3): 193-212.
31. Heinrich G, Pfeifhofer HW, Stabentheiner E, Sawidis T. (2000). Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil. *Annali di Botanica, Tipografia E. Voghera*, Rome. 89: 459-469.
32. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/Umbilicaria>
33. Jennings W. (2000). Chromatography Gas, in ID Wilson (Ed.), *Enciklopedija of separation science* (427-567), New York: Academic Press.
34. Joulain D, Tabacchi R. (2008). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. *Flavour and Fragrance Journal* 24: 49-61.
35. Joulain D, Tabacchi R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 2: treemoss. *Flavour and Fragrance Journal*, 24: 105-116.
36. Karakasevic B. (1987). *Mikrobiologija i parazitologija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga.
37. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay,

L I T E R A T U R A

- apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392 (1-2): 19-30.
38. Koparal AT, Tüylü BA, Türk H. (2006). *In-vitro* cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Natural Products Research*, 20: 1300-7.
39. Kuntić V. (2009). *Odabrane instrumentalne metode u medicinskoj biohemiji*, Beograd: Farmaceutski fakultet.
40. Kosanic M, Rankovic B, Stanojković T. (2012). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species. *Journal of Food Science*, 77 (1): 20-25.
41. Kosanic M, Manojlovic N, Jankovic S, Stanojkovic T, Rankovic B, (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents, *Food and Chemical Toxicology*, 53: 112–118.
42. Kosanic M, Šeklic S, Markovic M, Rankovic B. (2014). Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia, *Digest Journal of Nanomaterial and biostructures*, 9 (1): 273-287.
43. Lawrey JD. (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 89: 111-122.
44. Lawrey JD. (1989). Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. *Bryologist*: 326-328.
45. Lawrey JD. (1993). Lichens as monitors of pollutant elements at permanent sites in Maryland and Virginia. *Bryologist*, 96: 339–341.
46. Legaz ME, Vicente C, (1983). Endogenous inactivators of arginase, l-arginine decarboxylase, and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiology*, 71: 300-302.
47. Lee SK, Zakaria HM, Cheng HS, Luyengi L, Gamez EJC, Mehta R, Kinghorn AD, Pezzuto JM. (1989). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 1: 35-46.
48. Legaz ME, Vicente C, Pedrosa MM. (2001). Binding of lichen phenolics to purified secreted arginase from the lichen *Evernia prunastri*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 194-200.

L I T E R A T U R A

49. Matsubara H, Kinoshita K, Koyama K, Ye Y, Takahashi K, Yoshimura I, Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, (1997). Antityrosinase activity of lichen metabolites and their synthetic analogues. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 83: 179-185.
50. Myers P. (2000). Chromatography liquid. In ID Wilson (Ed.) *Enciklopedia of separation science* (568-789) New York: Academic Press.
51. Müller K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 9-16.
52. Molnara K, Farkas E, (2010). Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review, *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Journal of Biosciences*, 65.
53. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Čomić Lj 2, Đačić D, Ćurčić M, Marković S. (2011) Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *International Journal of Molecular Sciences* 12 (8): 5428-5448.
54. Manojlovic, NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. (2011). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011.
55. Mitrović T, Stamenković, S, Cvetković V, Radulović N, Mladenović M, Stanković M, Topuzović M, Radojević, I, Stefanović O, Vasić S, Čomić Lj. (2014) *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI Journal* 13: 938-953.
56. Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, George WAM, Proksa B, Pommier Y. (1997). Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40: 942-51.
57. Narui T, Sawada K, Takatsuki S, Okuyama T, Culberson CF, Culberson WL, Shibata S. (1998). NMR assignments of depsides and tridepsides of the lichen family Umbilicariaceae. *Phytochemistry*, 48(5): 815-822.
58. Nash TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F. (2002). *Lichen flora of the greater sonoran desert region*. Arizona: Arizona State University

L I T E R A T U R A

59. Nash, TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F. (2004). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region*. (Vol 2) Arizona., Arizona State University
60. Nash TH (2008). *Lichen Biology*, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
61. Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307-15.
62. Planelles V, Legaz ME. (1987). Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Science*, 51 (1): 9-16.
63. Papastefanou C, Manolopoulou M, Sawidis T. (1989). Lichens and mosses: biological monitors of radioactive fallout from the Chernobyl reactor accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 9 (3): 199-207.
64. Posner HB, Feige GB, Huneck S. (1992) Studies on the Chemistry of the Lichen Genus *Umbilicaria*. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: Journal of Biosciences*, 47c: 1 – 9.
65. Proksa B, Adamcová J, Sturdíková M, Fуска J. (1994). Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Die Pharmazie*, 49(4): 282-283.
66. Piluzza G, Bullitta S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical biology*, 49 (3): 240-247.
67. Pantelic G. (2016). *30 godina od Černobila*, monografija, Beograd: Institut za Nuklearne nauke „Vinča”, Laboratorija za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine „Zaštita”
68. Re R, Pellegrini N, Proreggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-7.
69. Rankovic B, Misic M, Sukdolak S. (2009). The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogimnia physodes*. *Byologia*, 64 (1): 53-58.
70. Sokolovski B. (1987). Bacillus. Karakasevic B (Ed.) (818-818). *Mikrobiologija i parazitologija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga.

L I T E R A T U R A

71. Stein SE. (1990). *Mass Spectral Database and Software*. Version 3.02 NIST. Gaithersburg, Md , USA: National Institute of Standards and Technology.
72. Seifert P, Bertram C. (1995). Usnic acid: natural preservation from lichens: Cosmetics: Wirkstoffe in Pharmazie und Kosmetik. *SÖFW. Seifen, Öle, Fette, Wachse*, 121 (7): 480-485.
73. Serina, E, Arroyo R, Manrique E, Sancho, LG. (1996). *Bryologist* 99, 335–342.
74. Singleton VL, Orthofer R, Lamula-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299: 152-178.
75. Stojanović G, Stojanović I, Stankov-Jovanović V, Mitić V, Kostić D. (2010). Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species. *Central European Journal of Biology* 5 (6): 808-813.
76. Stojanović I, Radulović N, Mitrović T, Stamenković S, Stojanović G. (2011). Volatile constituents of selected Parmeliaceae lichens. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 7 (7): 987–994.
77. Stojanović I, Stanković V, Jovanović O, Petrović G, Šmelcerović A, Stojanović G. (2013). Effect of *Hypogymnia physodes* extracts and their depsidones on micronucleus distribution in human lymphocytes. *Natural product communication*, 8: 109-112.
78. Stamenkovic S, Mitrovic T, Cvetkovic V, Krstic N, Baosic R, Markovic M, Nikolic N, Markovic V, Cvijan M. (2013) Biological indication of heavy metal pollution in the areas of Donje Vlase and Cerje (Southeastern Serbia) using epiphytic lichens. *Archives of Biological Science*, 65 (1): 151-159.
79. Stankov Jovanovic V, Ilic M, Mitic V, Mihajilov-Krstev T, Simonovic S, Nikolic-Mandic S, Tabet JC, Cole RB, (2015). Secondary metabolites of *Seseli rigidum*: Chemical composition plus antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibition activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 111: 78-90.
80. Turk H, Yilmaz M, Tay T, Turk AO, Kivanc M. (2006). Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudovernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatratorin, atratorin and olivetoric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Journal of Biosciences* 61: 499-507.

L I T E R A T U R A

81. Türkez H, Geyikoglu F, Aslan A, Karagöz Y, Türkez O, Anar M. (2010). Antimutagenic effects of lichen *Pseudovernia furfuracea* (L.) Zoph. extracts against the mutagenicity of aflatoxin B1 *in vitro*. *Toxicology and Industrial Health*, 26: 625-31.
82. Vucković I, Vajs V, Stanković M, Tesević V, Milosavljević S. (2010). A new prenylated flavanonol from *Seseli annuum* roots showing protective effect on human lymphocytes DNA. *Chemistry and Biodiversity*, 7: 698-704.
83. Woo ER, Fujii I, Ebizuka Y, Sankawa U, Kawaguchi A, Huang S, Beale JM, Shibuya M, Mocek U, Floss HG, (1989). Nonstereospecific proton removal in the enzymatic formation of orsellinic acid from chiral malonate. *Journal of the American Chemical Society*, 111: 5498-5500.
84. Xiandeng H, Jones B. (2000). Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry in R.A. Meyers (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (9468–9485). Chichester: Wiley & Sons Ltd.
85. Yılmaz M, Tay T, Kivanc M, Türk H, Türk AO. (2005) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and Its 3-Hydroxyphysodic Acid Constituent. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C: Journal of Biosciences*, 60 (1-2): 35-38.
86. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Koshimizu K. (1995). Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43 (8): 1388-1390.
87. Zrnzevic I, Zlatanovic I, Lazarevic J, Jovanovic O, Stojanovic G. (2015) GC-MS analysis of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. Extract. *Facta universitatis (Series: physics, chemistry and technology)*, 13 (2): 91-97.

7. PRILOG

Spisak priloga

UV spektri

- Prilog 1. UV spektar metil-orselinata
- Prilog 2. UV spektar salazinske kiseline
- Prilog 3. UV spektar norstiktik kiseline
- Prilog 4. UV spektar metil- β -orcinol-karboksilata
- Prilog 5. UV spektar everninične kiseline
- Prilog 6. UV spektar evernične kiseline
- Prilog 7. UV spektar lekanorne kiseline
- Prilog 8. UV spektar metil-lekanorata
- Prilog 9. UV spektar fizodične kiseline
- Prilog 10. UV spektar 3-hidroksifizodične kiseline
- Prilog 11. UV spektar fizodalične kiseline
- Prilog 12. UV spektar 4-*O*-metil-fizodične kiseline
- Prilog 13. UV spektar giroforne kiseline
- Prilog 14. UV spektar krustinske kiseline
- Prilog 15. UV spektar atranorina
- Prilog 16. UV spektar hloratranorina
- Prilog 17. UV spektar usninske kiseline

HPLC hromatogrami

- Prilog 18. HPLC hromatogrami etarskog, etil-acetatnog i acetonskog ekstrakta lišaja *U. crustulosa*
- Prilog 19. HPLC hromatogrami etarskog, etil-acetatnog i dihlormetanskog ekstrakta lišaja *U. cylindrica*

PRILOG

Prilog 20. HPLC hromatogrami acetonskog, etarskog, etil-acetatnog i dihlormetanskog ekstrakata lišaja *E. prunastri*

Prilog 21. HPLC hromatogrami acetonskog, etarskog, etil-acetatnog i dihlormetanskog ekstrakata lišaja *H. tubulosa*

GC-MS hromatogrami

Prilog 22. GC-MS spektar acetonskog ekstrakta *U. crustulosa*

Prilog 23. GC-MS spektar etarskog ekstrakta *U. crustulosa*

Prilog 24. GC-MS spektar etil-acetatnog ekstrakta *U. crustulosa*

Prilog 25. GC-MS spektar dihlormetanskog ekstrakta *U. crustulosa*

Prilog 26. GC-MS spektar acetonskog ekstrakta *U. cylindrica*

Prilog 27. GC-MS spektar etarskog ekstrakta *U. cylindrica*

Prilog 28. GC-MS spektar etil-acetatnog ekstrakta *U. cylindrica*

Prilog 29. GC-MS spektar dihlormetanskog ekstrakta *U. cylindrica*

Prilog 30. GC-MS spektar acetonskog ekstrakta *E. prunastri*

Prilog 31. GC-MS spektar etarskog ekstrakta *E. prunastri*

Prilog 32. GC-MS spektar etil-acetatnog ekstrakta *E. prunastri*

Prilog 33. GC-MS spektar dihlormetanskog ekstrakta *E. prunastri*

Prilog 34. GC-MS spektar acetonskog ekstrakta *H. tubulosa*

Prilog 35. GC-MS spektar etarskog ekstrakta *H. tubulosa*

Prilog 36. GC-MS spektar etil-acetatnog ekstrakta *H. tubulosa*

Prilog 37. GC-MS spektar dihlormetanskog ekstrakta *H. tubulosa*

Maseni spektri

Prilog 38. (EI)MS spektar orcinola

Prilog 39. (EI)MS spektar etil-orselinata

Prilog 40. (EI)MS spektar orselinske kiseline

Prilog 41. (EI) MS spektar atrarične kiseline

Prilog 42. (EI)MS spektar sterola 1

PRILOG

Prilog 43. (EI)MS spektar sterola 2

Prilog 44. (EI)MS spektar orcinol-monometil-etra

Prilog 45. (EI)MS spektar β -orcinola

Prilog 46. (EI)MS spektar hloratranola

Prilog 47. (EI)MS spektar atranola

Prilog 48. (EI)MS spektar olivetola

Prilog 49. (EI)MS spektar olivetonida

Prilog 50. (EI)MS spektar 3-hidroksiolivetonida

NMR spektri

Prilog 51. ^1H NMR spektar metil-orselinata

Prilog 52. ^{13}C NMR spektar metil-orselinata

Prilog 53. ^1H NMR spektar lekanorne kiseline

Prilog 54. ^{13}C NMR spektar lekanorne kiseline

Prilog 55. ^1H NMR spektar metil-lekanorata

Prilog 56. ^{13}C NMR spektar metil-lekanorata

Prilog 57. ^1H NMR spektar giroforne kiseline

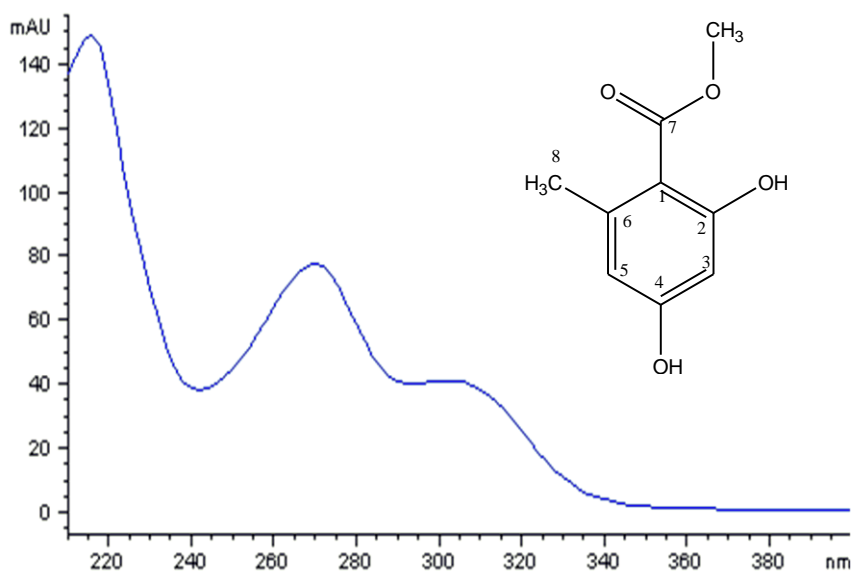
Prilog 58. ^{13}C NMR spektar giroforne kiseline

PRILOG

UV spektri

Prilog 1. UV spektar metil-orselinata

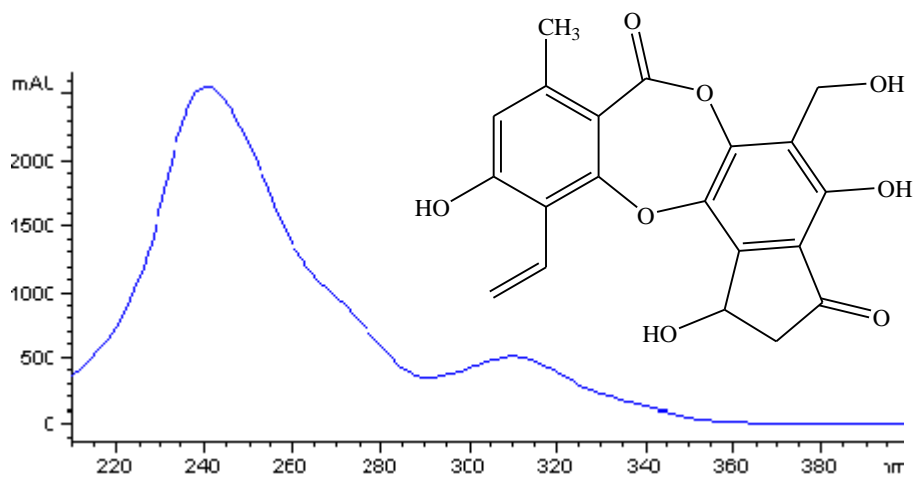
Metil-orselinat, $C_9H_{10}O_4$ (Mw 182), Metil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat



UV max (acetone): 218, 270, 308 nm

Prilog 2. UV spektar salazinske kiseline

Salazinska kiselina, $C_{18}H_{12}O_{10}$ (Mw 388); 1,4,10-trihidroksi-5-(hidroksimetil)-8-metil-3,7-diokso-1,3-dihidro-7H-2,6,12-trioksabenz[5,6]ciklohepta[1,2-e]inden-11-karbaldehid

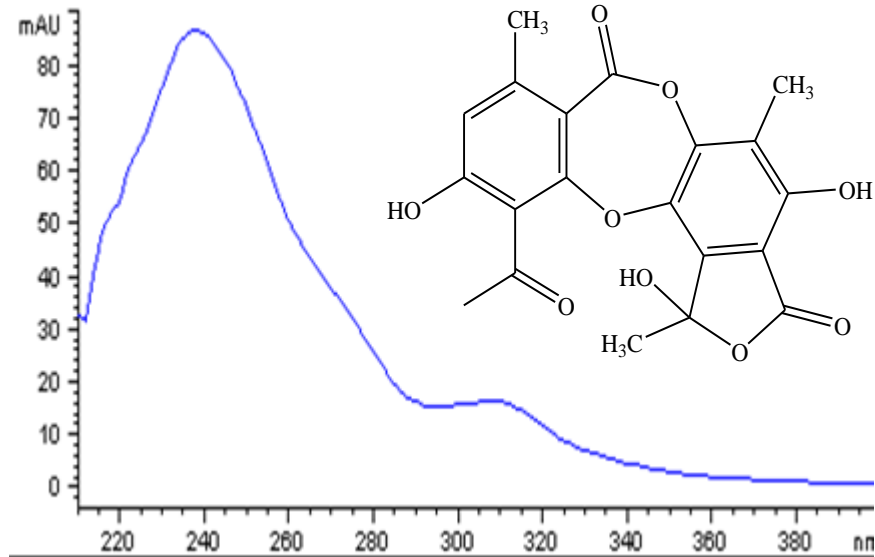


UV max (acetone): 212, 242, 312 nm

PRILOG

Prilog 3. UV spektar norstiktik kiseline

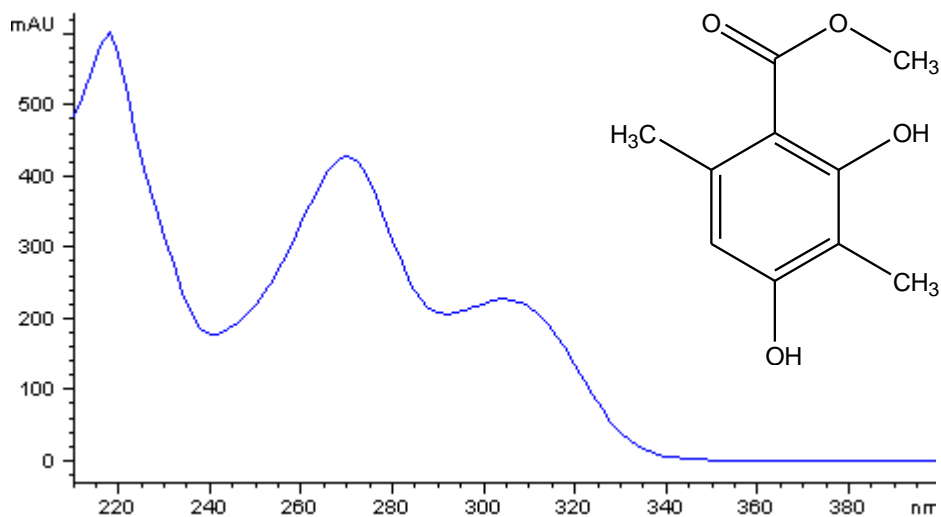
Norstiktik kiselina, $C_{18}H_{12}O_9$ (Mw 372.28); 1,3-Dihidro-1,4,10-trihidroksi-5,8-dimetil-3,7-diokso-7H-izobenzofuro(4,5-b)(1,4)benzodioksepin-11-karbaldehid



UV max (acetone): 212, 238, 310 nm

Prilog 4. UV spektar metil- β -orcinol-karboksilata

Metil- β -orcinol-karboksilat, Sinonim: Atrarična kiselina, $C_{10}H_{12}$ (Mw= 196); Metil-2,4-dihidroksi-3,6-dimetil-benzoat

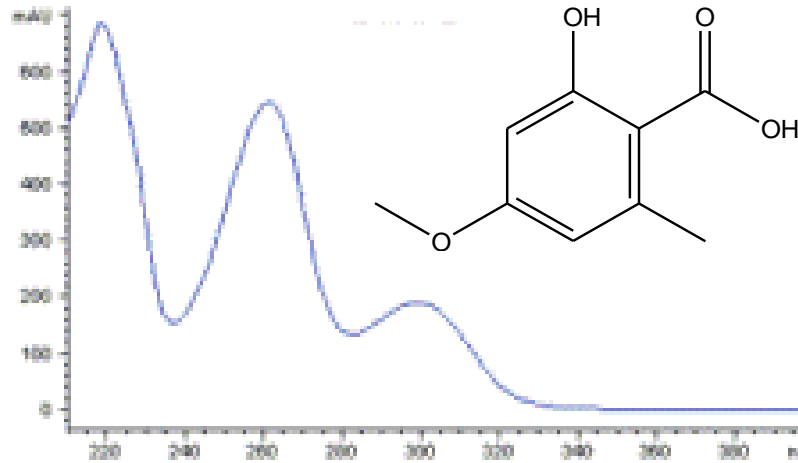


UV max (acetone): 218, 268, 304 nm

PRILOG

Prilog 5. UV spektar everninične kiseline

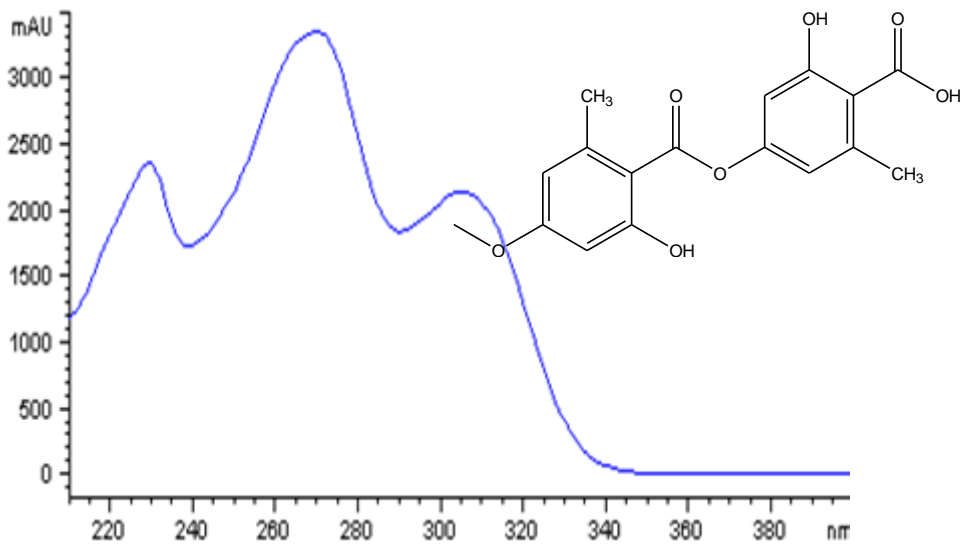
Everninična kiselina, $C_{17}H_{16}O_7$ (Mw 332); 2-hidroksi-4-[(2-hidroksi-4-metoksi-6-metilfenil)-oksometoksi]-6-metilbenzoeva kiselina



UV max (acetone): 222, 260, 300 nm

Prilog 6. UV spektar evernične kiseline

(12) Evernična kiselina, $C_{17}H_{16}O_7$ (Mw 332,3); 2-hidroksi-4-(2-hidroksi-4-metoksi-6-metilbenzoi)oksi-6-metilbenzoeva kiselina

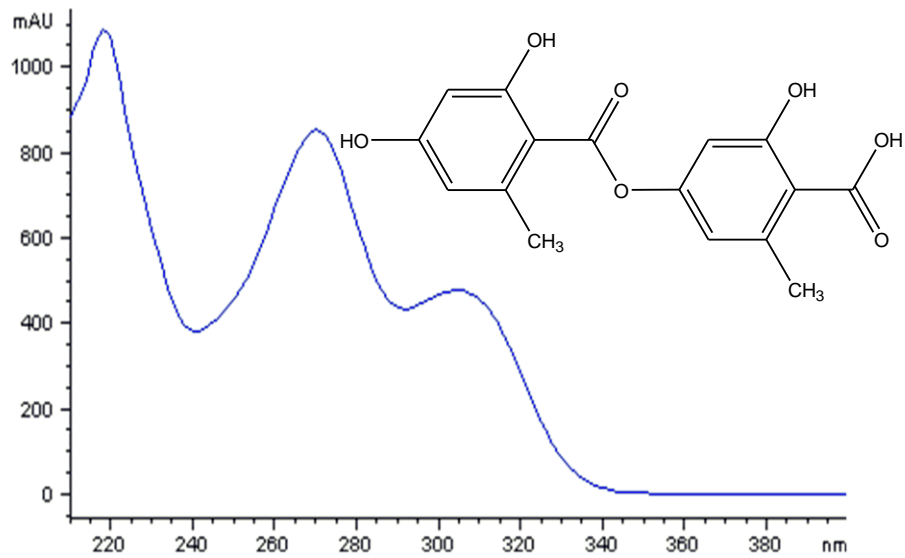


UV max (acetone): 215, 270, 310 nm

PRILOG

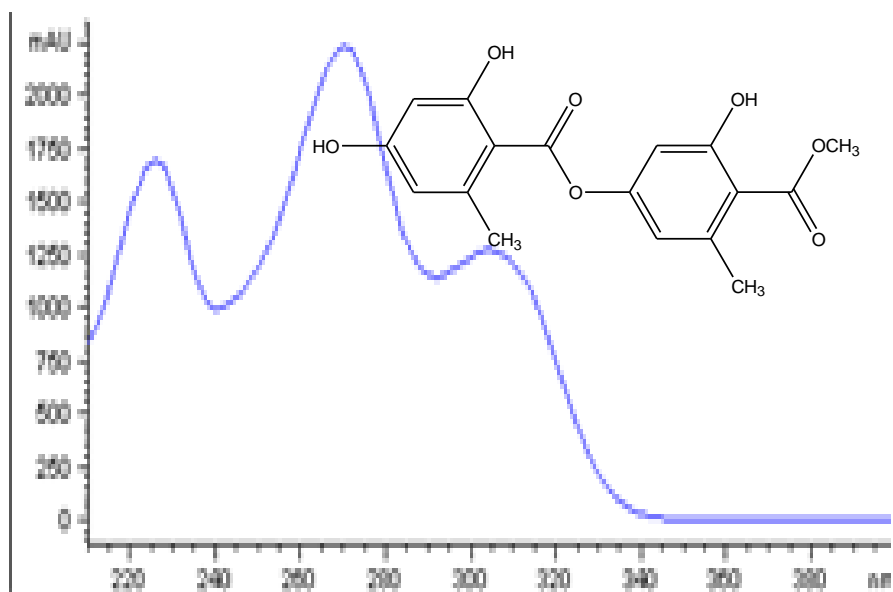
Prilog 7. UV spektar lekanorne kiseline

Lekanorna kiselina, $C_{16}H_{14}O_7$ (Mw 318); 4-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoeva kiselina



Prilog 8. UV spektar metil-lekanorata

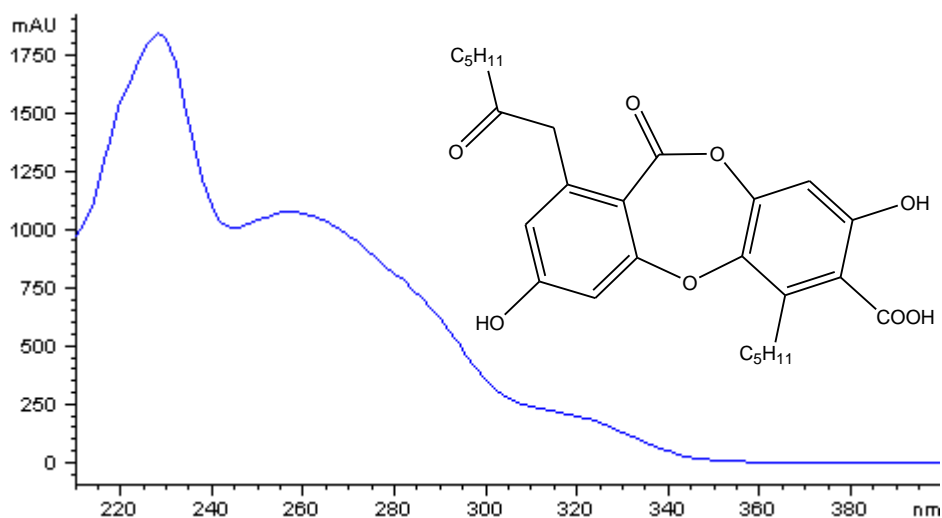
Metil-lekanorat, $C_{17}H_{16}O_7$ (Mw 332); Metil-4-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoat



PRILOG

Prilog 9. UV spektar fizodične kiseline

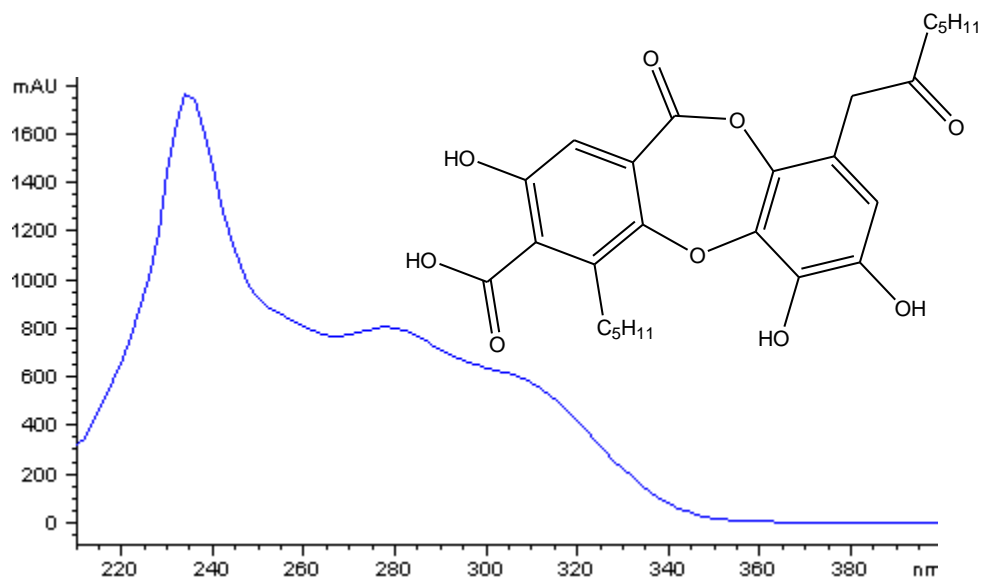
Fizodična kiselina, $C_{26}H_{30}O_8$ (Mw 470.5) $m/z = 469,18643 [M-H]^-$, 2, 3, 8-dihidroksi-11-okso-1-(2-oksoheptil)-6-pentil-11*H*-dibenzo[*b,e*][1,4]dioksepin-7-karboksilna kiselina



UV max (acetone): 232, 262, 318 nm

Prilog 10. UV spektar 3-hidroksifizodične kiseline

3-hidroksifizodična kiselina, $C_{26}H_{30}O_9$; $m/z = 485,18105 [M-H]^-$; 3,9-dihidroksi-6-okso-7-(2-oksoheptil)-1-pentilbenzo[*b*][1,4]benzodiosksepin-2-karboksilna kiselina

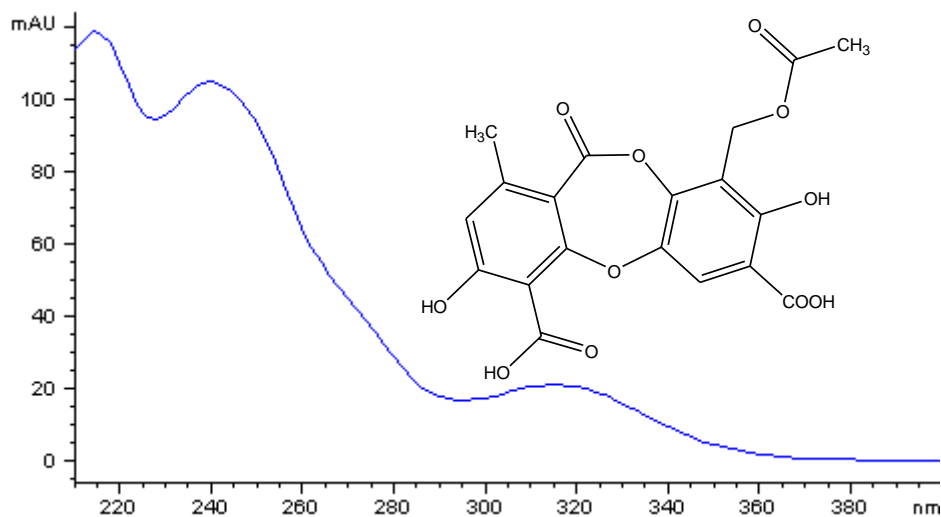


UV max (acetone): 230, 280, 310 nm

PRILOG

Prilog 11. UV spektar fizodalične kiseline

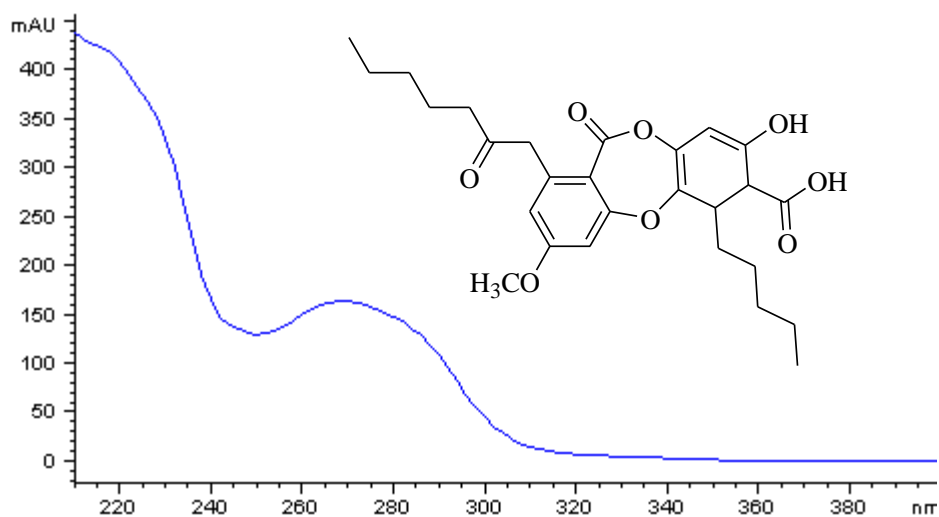
Fizodalična kiselina, $C_{20}H_{16}O_{10}$; $m/z = 415,06652 [M-H]^-$; 4-(acetiloksimetil)-10-formil-3,9-dihidroksi-1,7-dimetil-6-oksobenzo[b][1,4]benzodiosksepin-2-karboksilna kiselina



UV max (acetone): 210, 245, 315 nm

Prilog 12. UV spektar 4-O-metilfizodične kiseline

4-O-metilfizodična kiselina, $C_{27}H_{32}O_8$ (Mw 484)

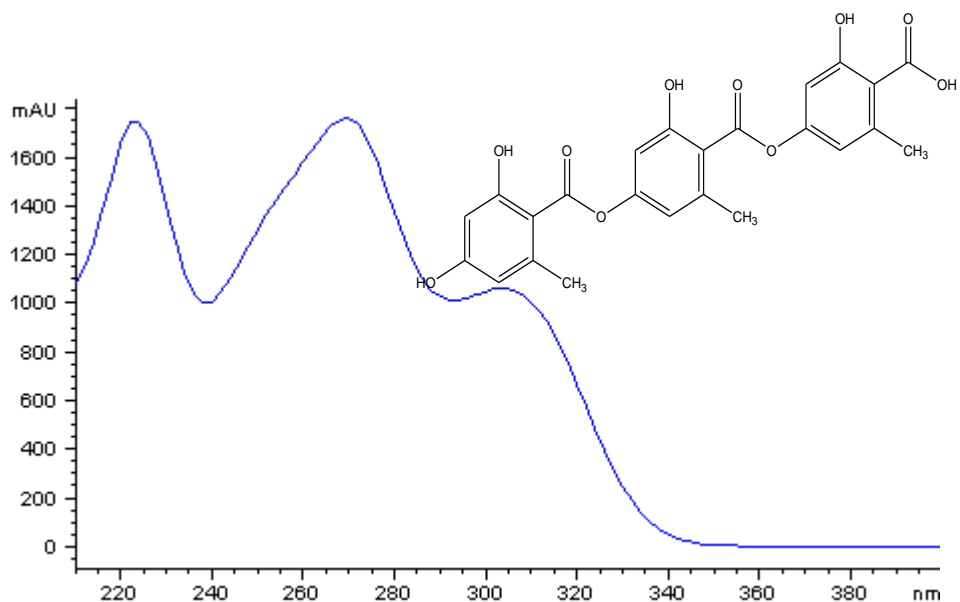


UV max (acetone): 215, 270 nm

PRILOG

Prilog 13. UV spektar giroforne kiseline

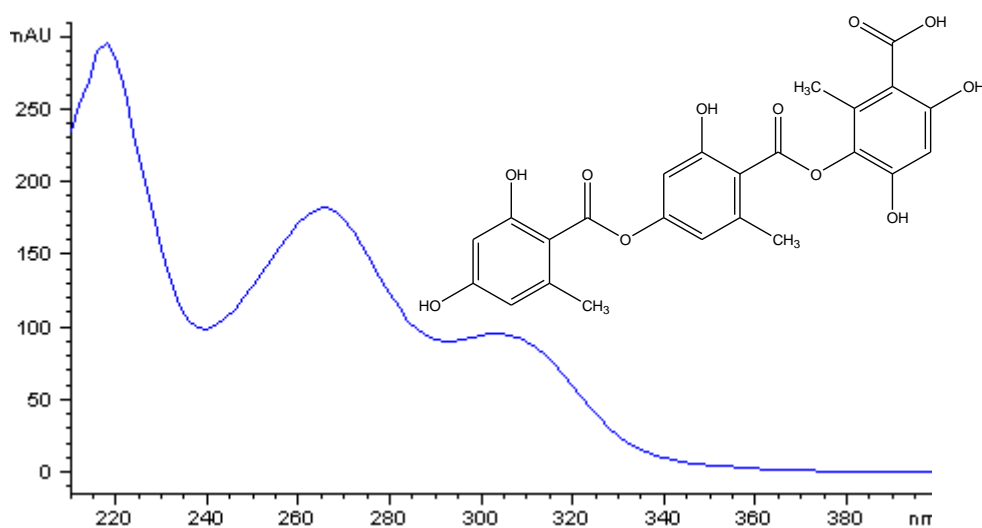
Giroforna kiselina, $C_{24}H_{20}O_{10}$ (Mw 468); 4-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoeva kiselina



UV max (acetone): 225, 270, 310 nm

Prilog 14. UV spektar krustinske kiseline

Krustinska kiselina, $C_{24}H_{20}O_{11}$ (Mw 484); 3-[4-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoil)oksi-2-hidroksi-6-metilbenzoil]oksi-4,6-dihidroksi-2-metilbenzoeva kiselina

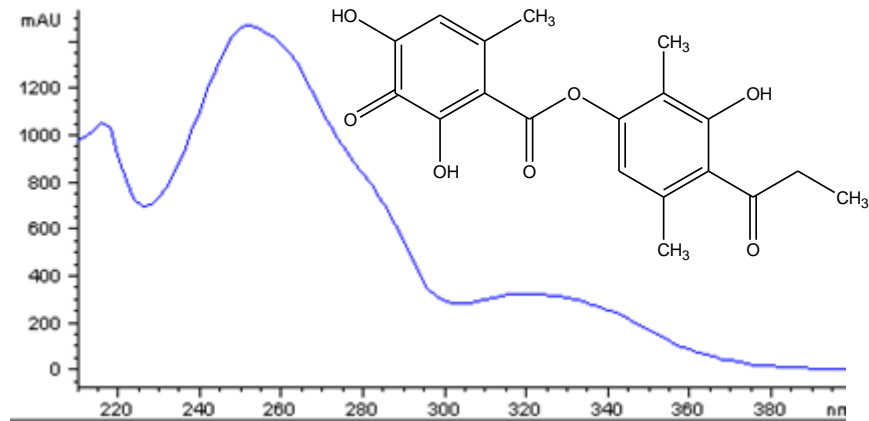


UV max (acetone): 220, 268, 308 nm

PRILOG

Prilog 15. UV spektar atranorina

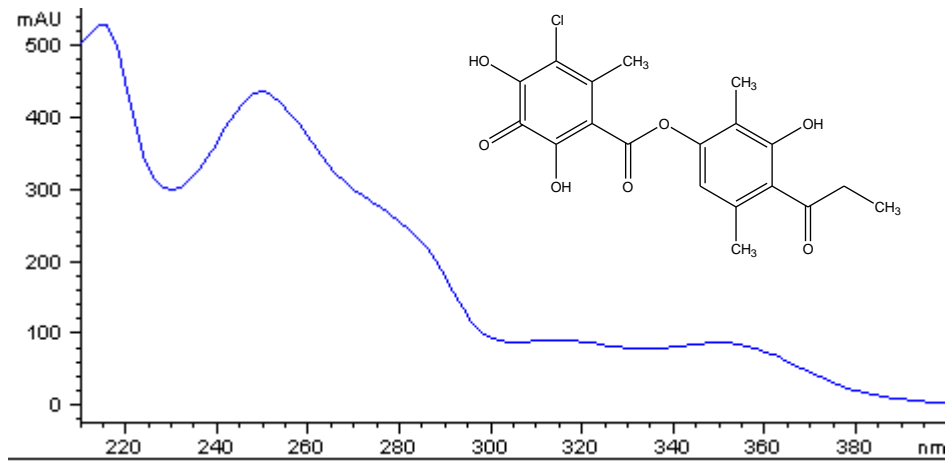
Atranorin, $C_{19}H_{18}O_8$ (Mw 374); (3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil)3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat



UV max (acetone): 215, 260, 330 nm

Prilog 16. UV spektar hloratranorina

Hloratranorin; $C_{19}H_{17}ClO_8$ (Mw 408,7); (3-hidroksi-4-metoksikarbonil-2,5-dimetilfenil)-5-hloro-3-formil-2,4-dihidroksi-6-metilbenzoat

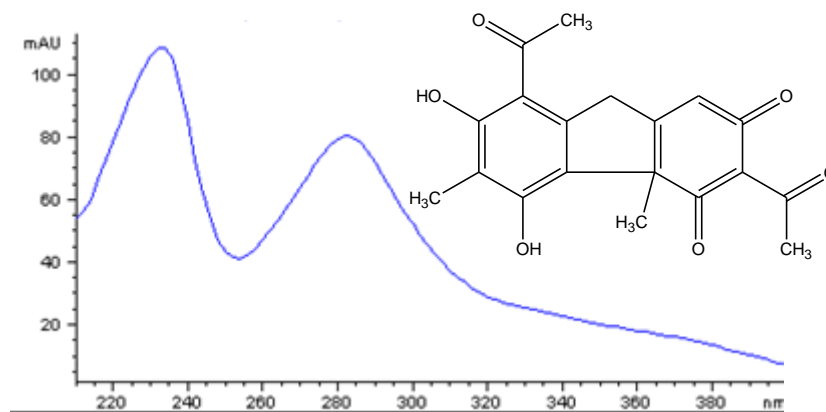


UV max (acetone): 215, 260, 320, 360 nm

PRILOG

Prilog 17. UV spektar usninske kiseline

(14) Usninska kiselina; $C_{18}H_{16}O_7$ (Mw 344.3); 2,6-diacetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetildibenzofuran-1,3-dione

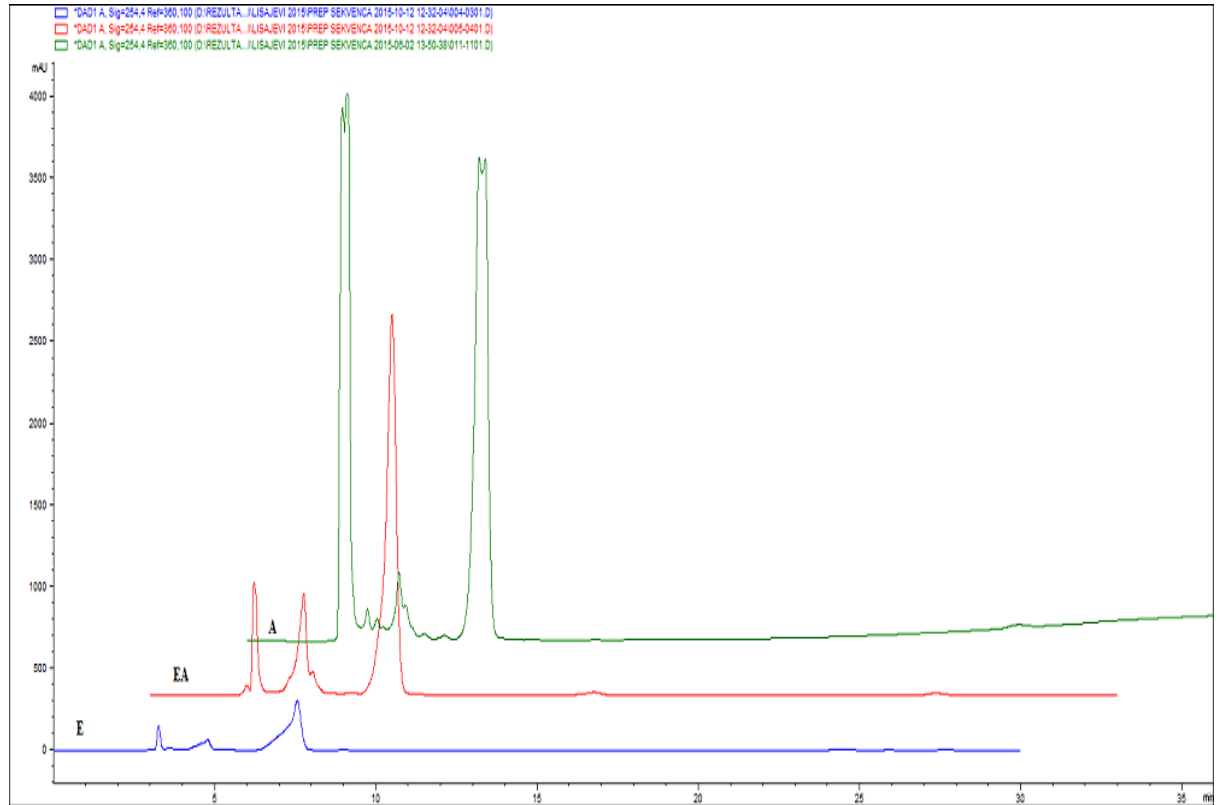


UV max (acetone): 230, 280 nm

PRILOG

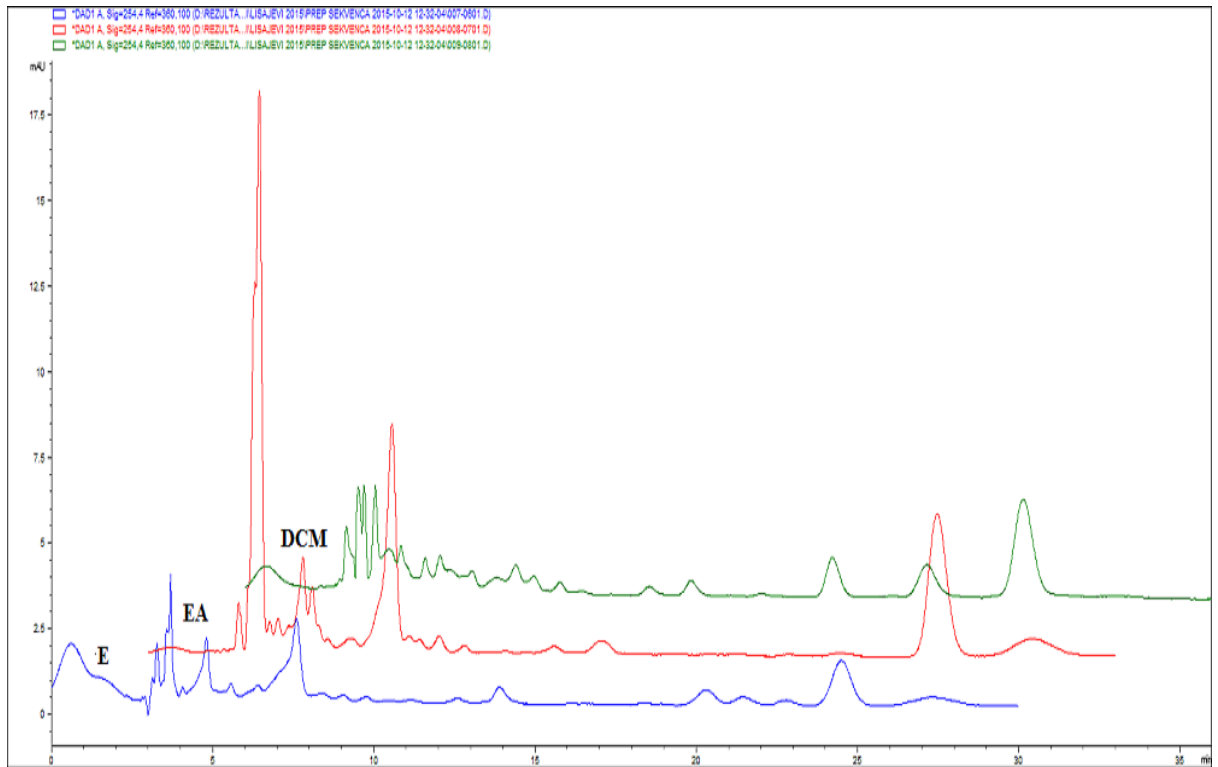
HPLC hromatogrami

Prilog 18. HPLC hromatogrami etarskog (E), etil-acetatnog (EA) i acetonskog (A) ekstrakta lišaja *U. crustulosa*

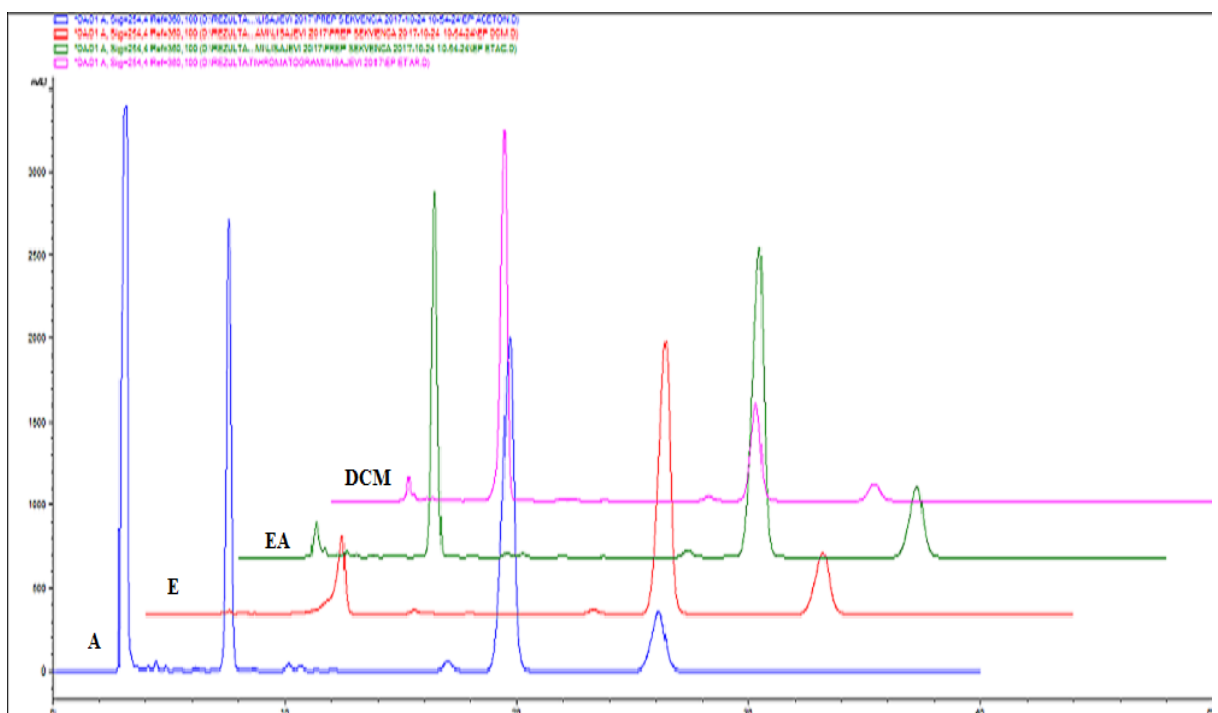


PRILOG

Prilog 19. HPLC hromatogrami etarskog (E), etil-acetatnog (EA) i dihlormetanskog (DCM) ekstrakta lišaja *U. cylindrica*

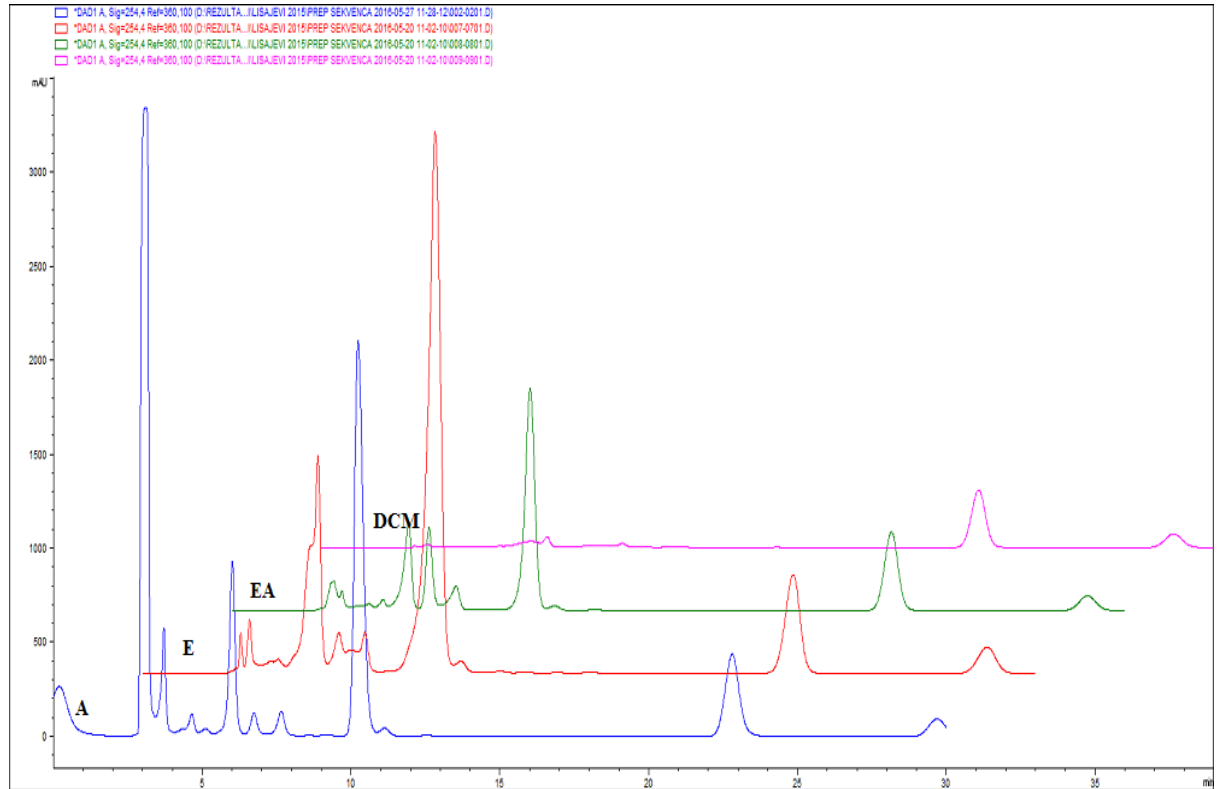


Prilog 20. HPLC hromatogram acetonskog (A) etarskog (E), etil-acetatnog (EA) i dihlormetanskog (DCM) ekstrakta lišaja *E. prunastri*



PRILOG

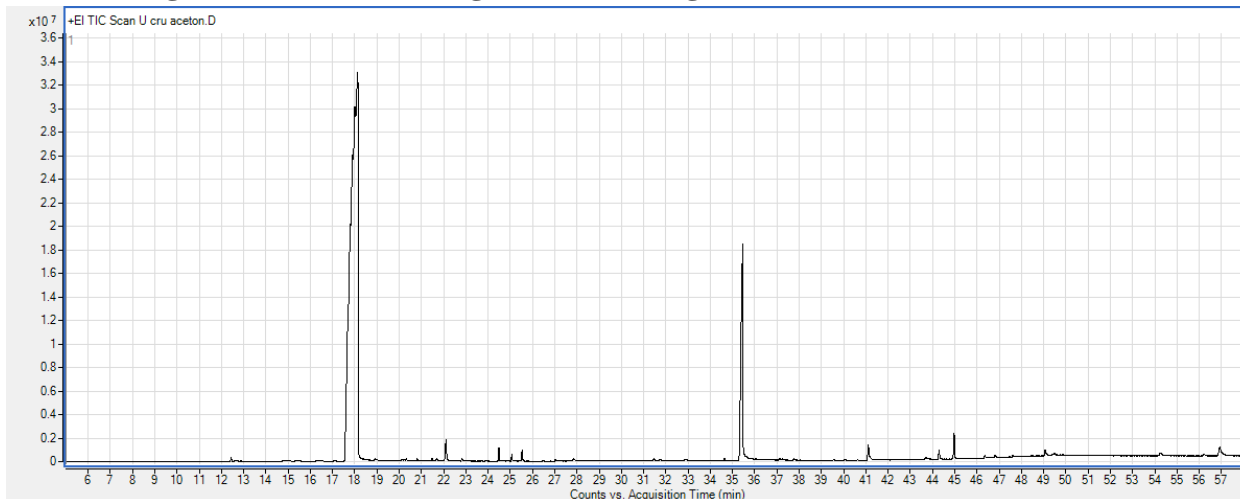
Prilog 21. HPLC hromatogrami acetonskog (A) etarskog (E), etil-acetatnog (EA) i dihlormetanskog (DCM) ekstrakta lišaja *H. tubulosa*



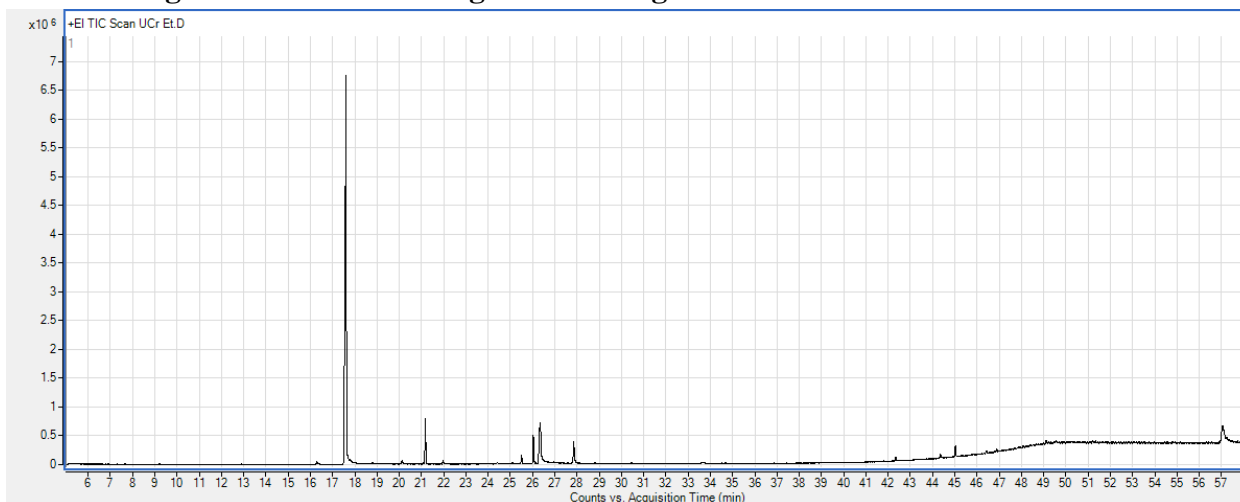
PRILOG

GC-MS hromatogrami

Prilog 22. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta *U. crustulosa*

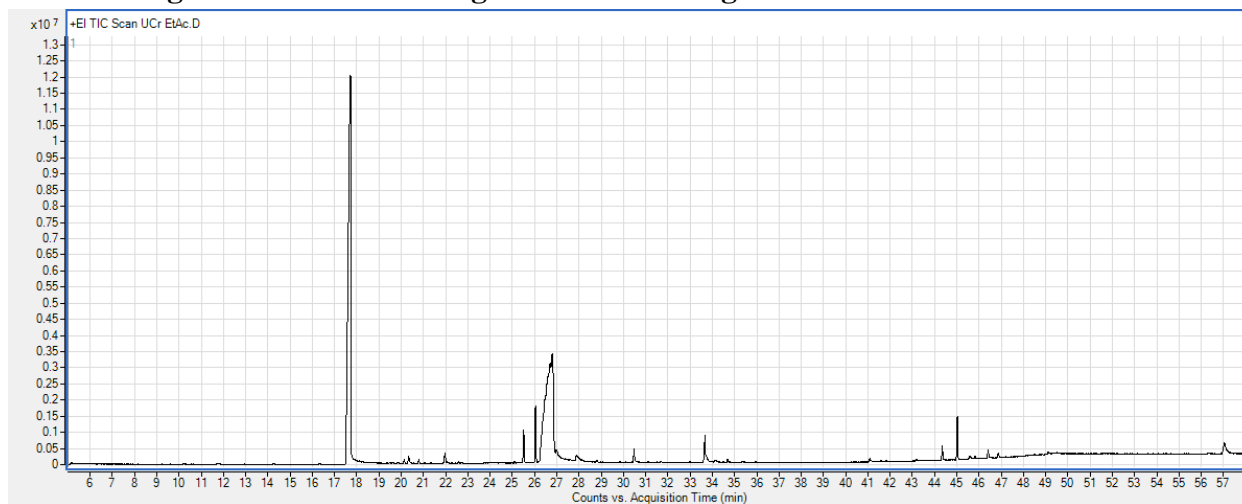


Prilog 23. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta *U. crustulosa*

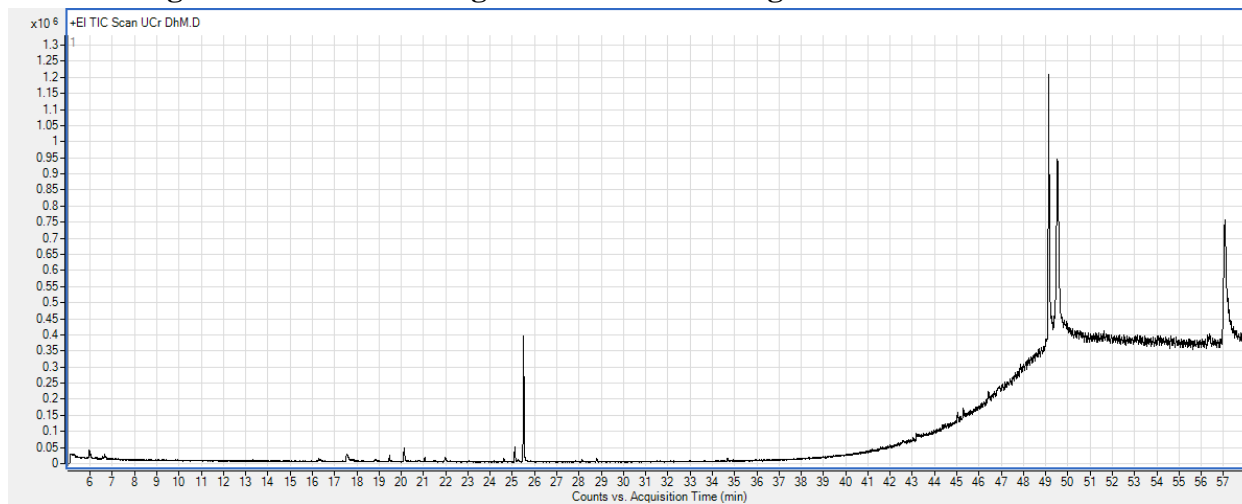


PRILOG

Prilog 24. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta *U. crustulosa*

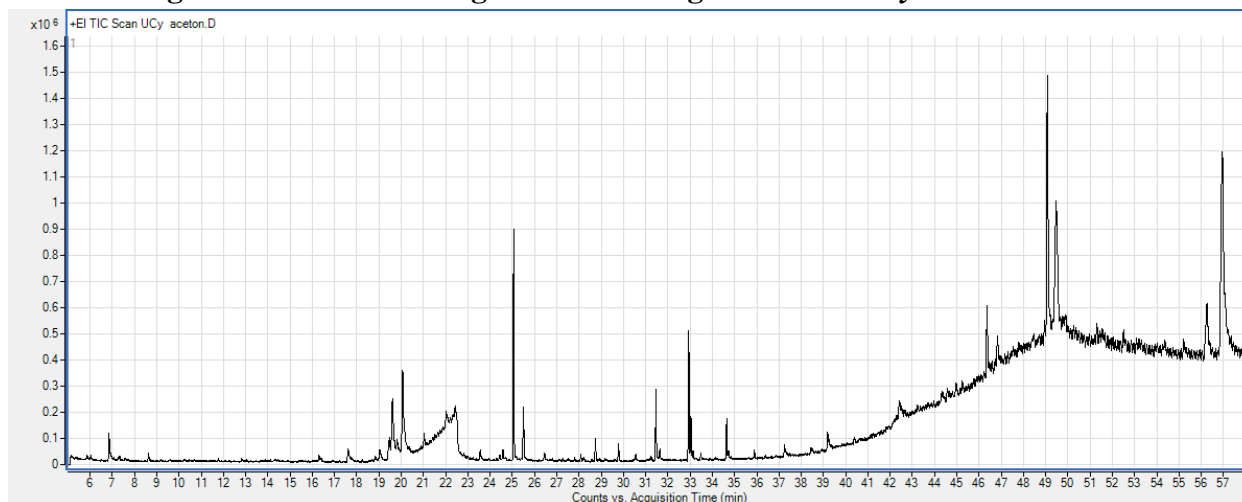


Prilog 25. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta *U. crustulosa*

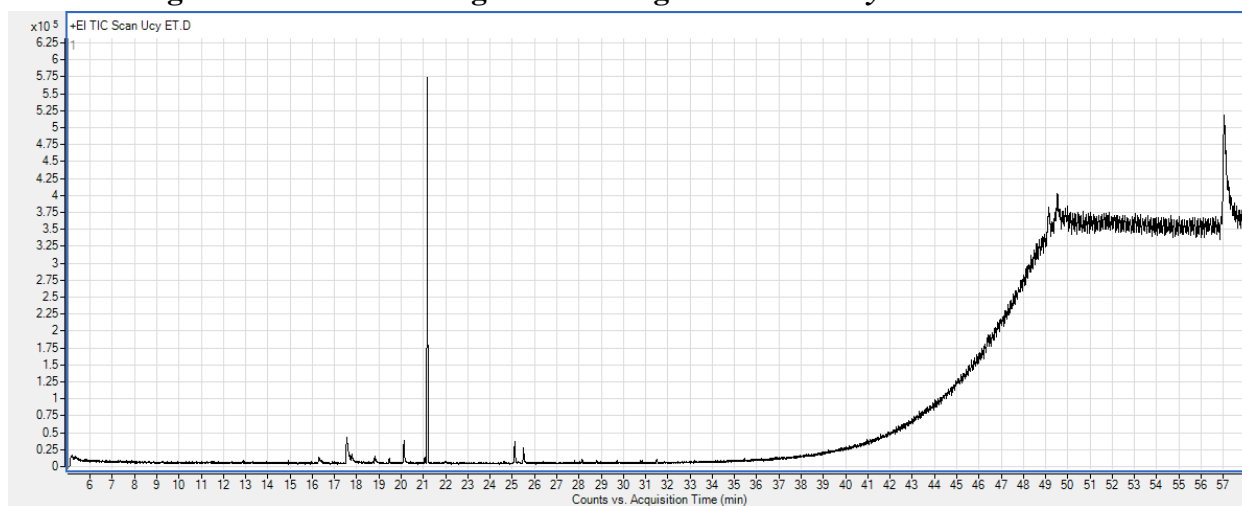


PRILOG

Prilog 26. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta *U. cylindrica*

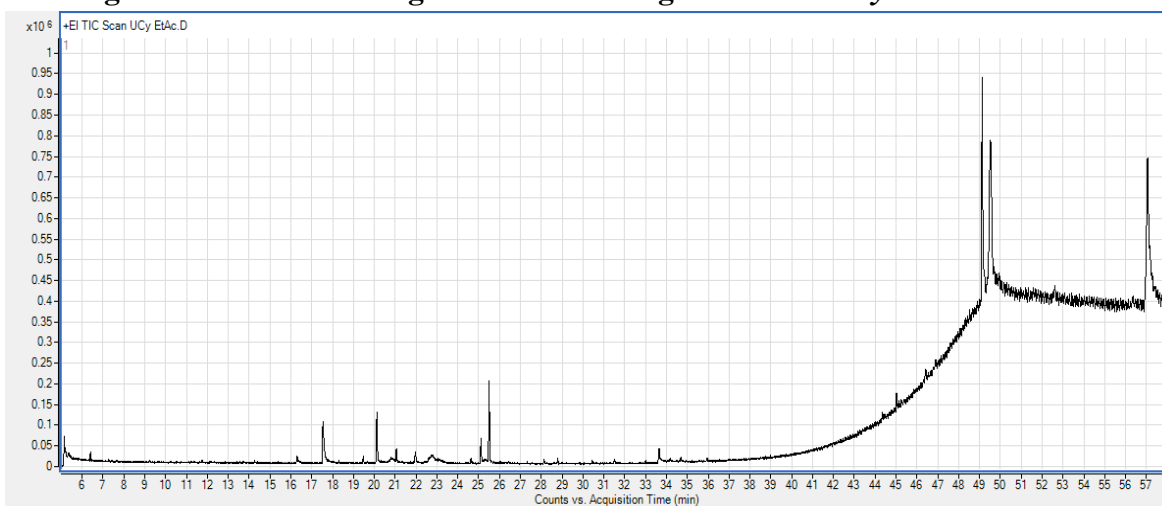


Prilog 27. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta *U. cylindrica*

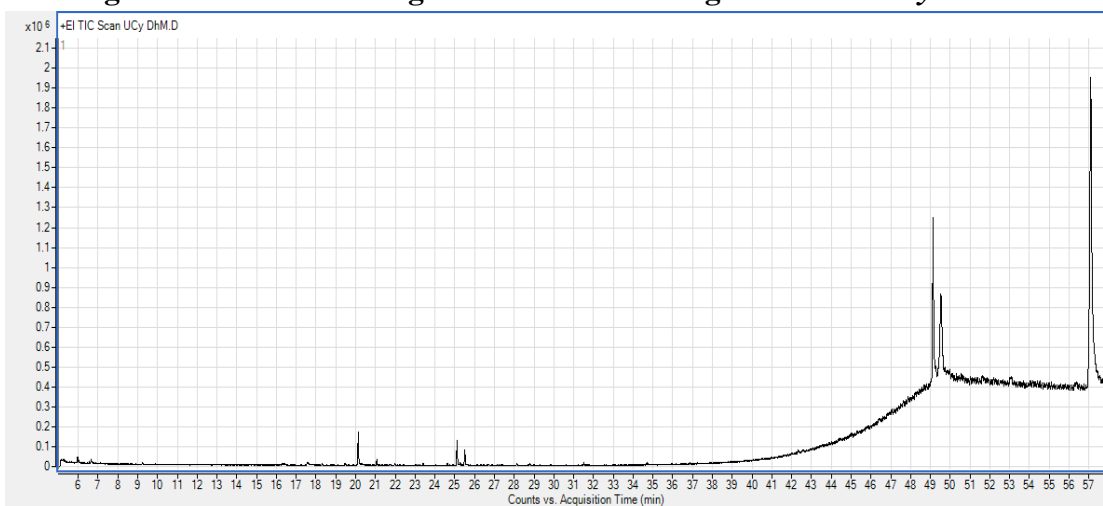


PRILOG

Prilog 28. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta *U. cylindrica*

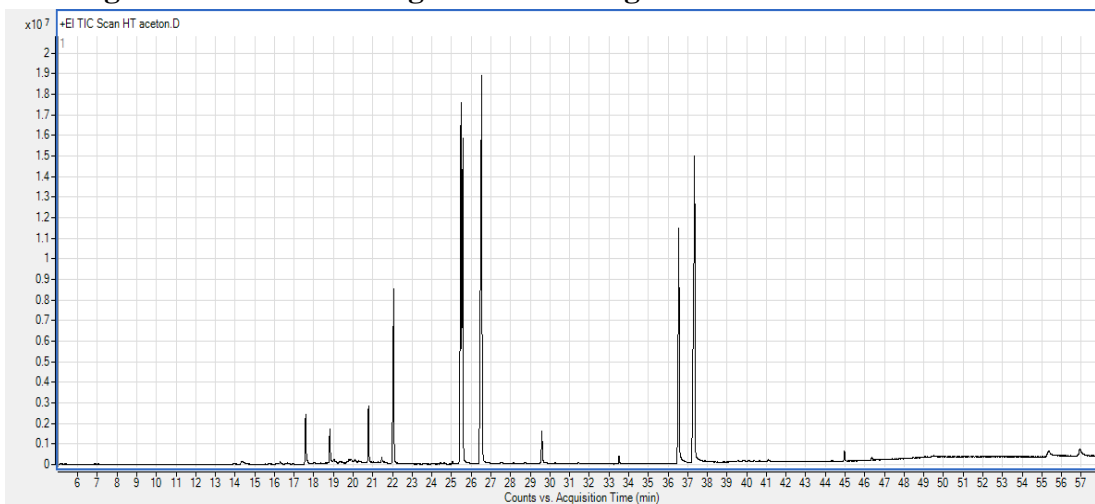


Prilog 29. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta *U. cylindrica*

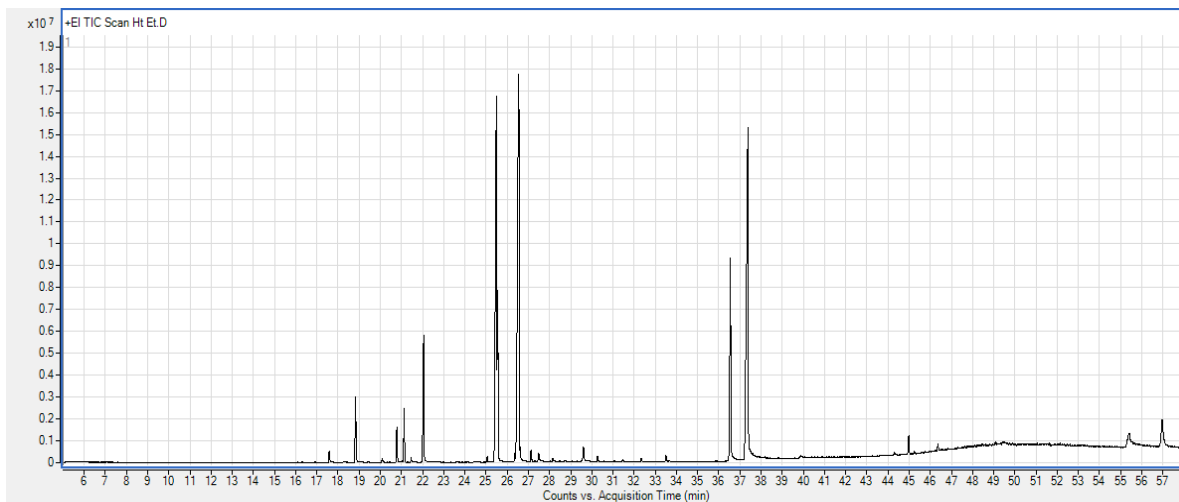


PRILOG

Prilog 30. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta *H. tubulosa*

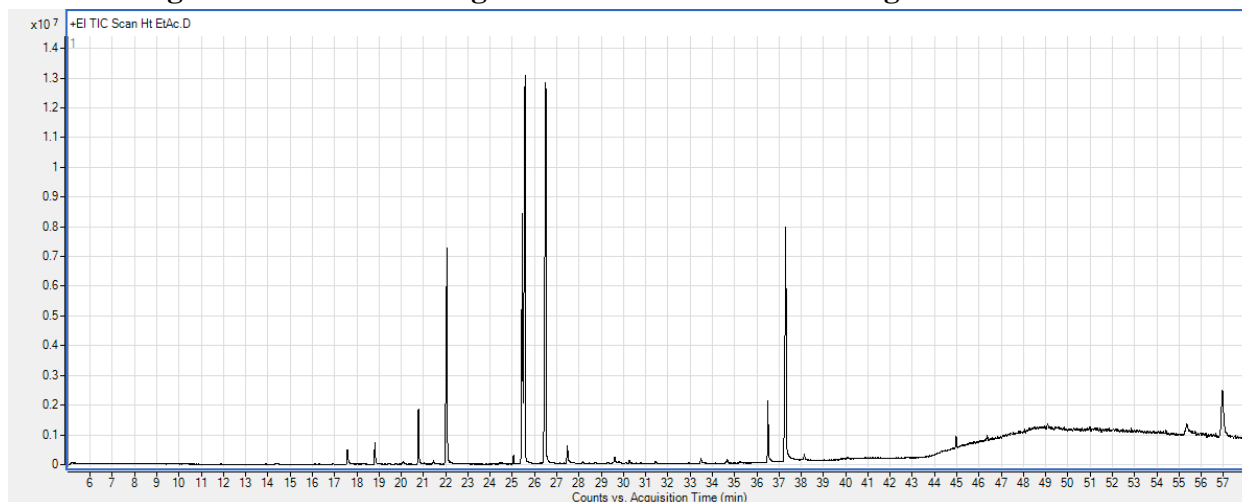


Prilog 31. GC-MS hromatogram *H. tubulosa* etarskog ekstrakta

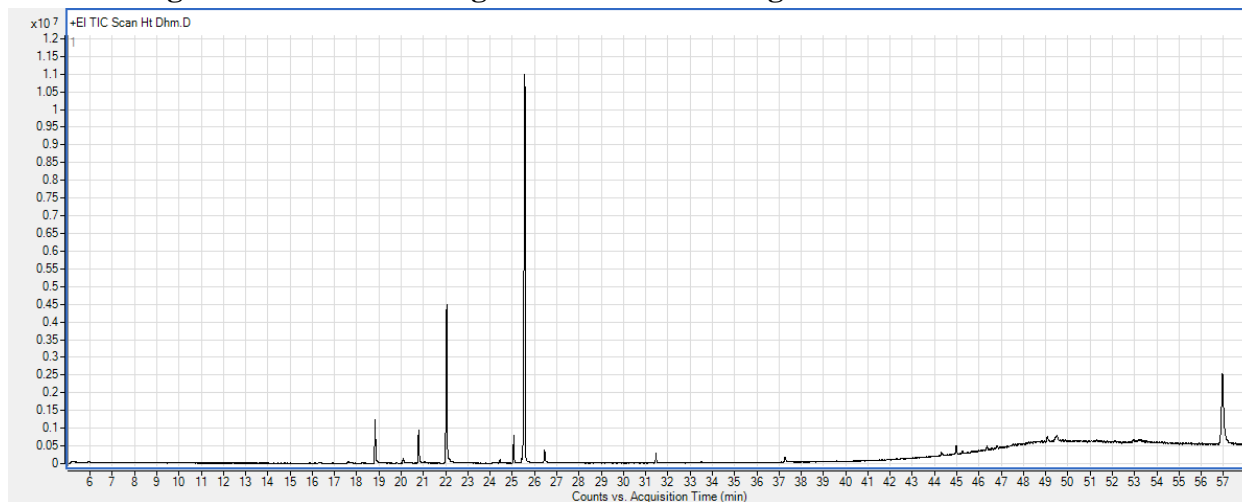


PRILOG

Prilog 32. GC-MS hromatogram *H. tubulosa* etil-acetatnog ekstrakta

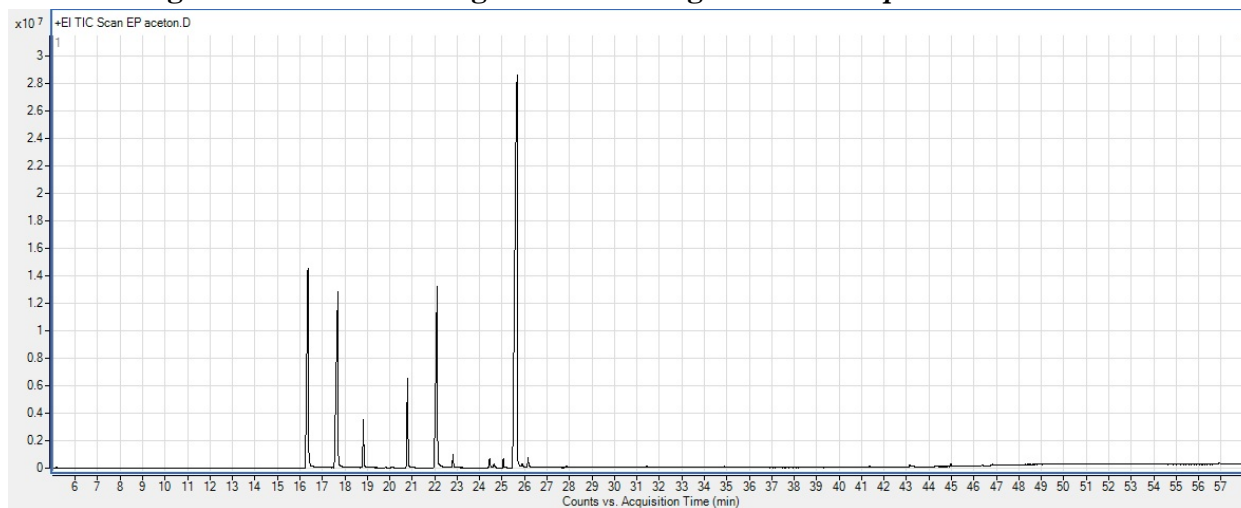


Prilog 33. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta *H. tubulosa*

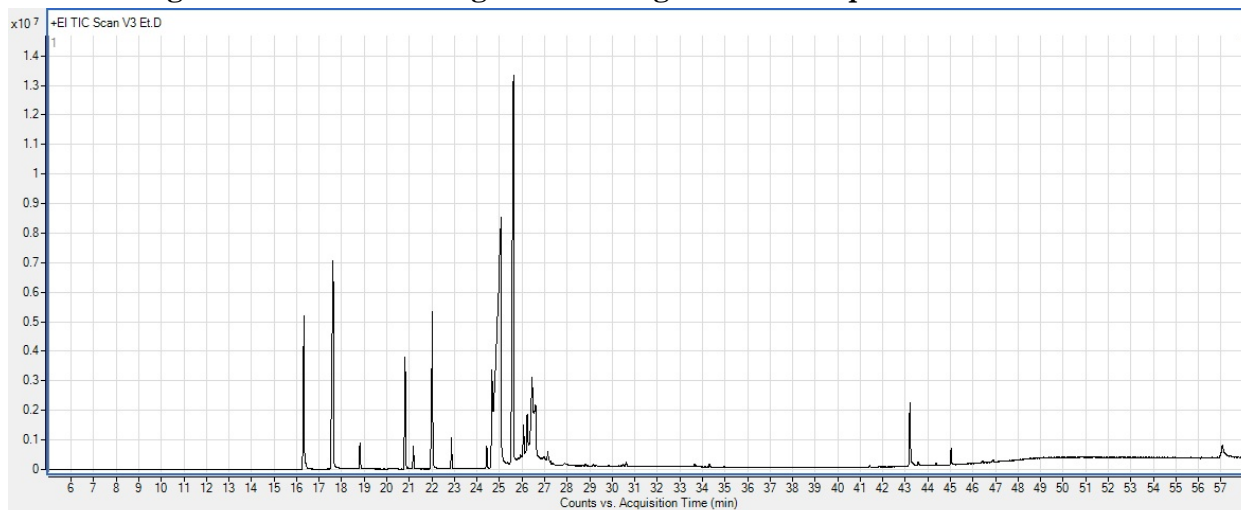


PRILOG

Prilog 34. GC-MS hromatogram acetonskog ekstrakta *E. prunastri*

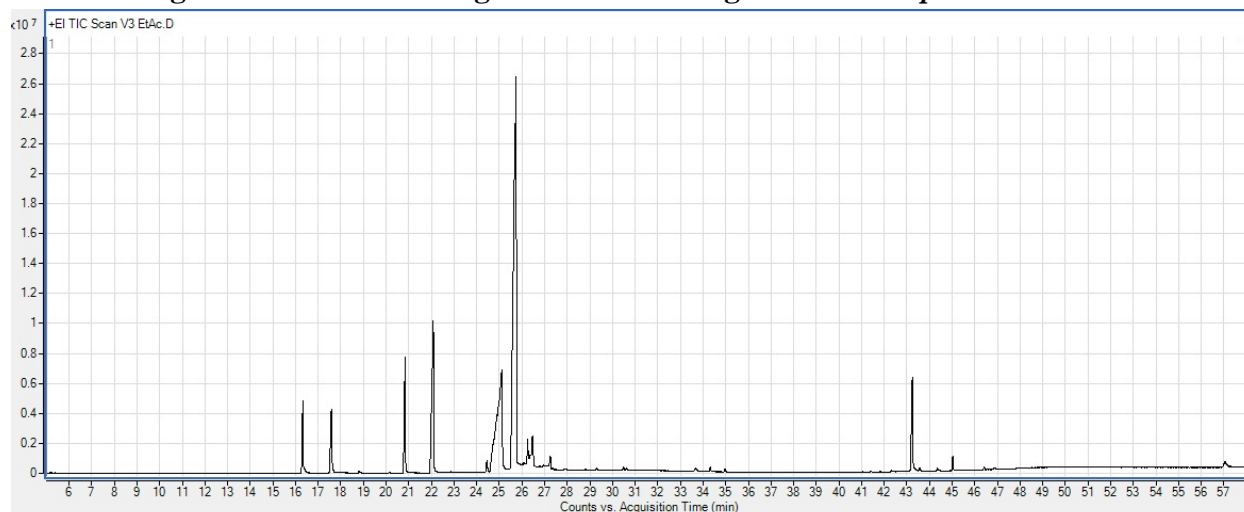


Prilog 35. GC-MS hromatogram etarskog ekstrakta *E. prunastri*

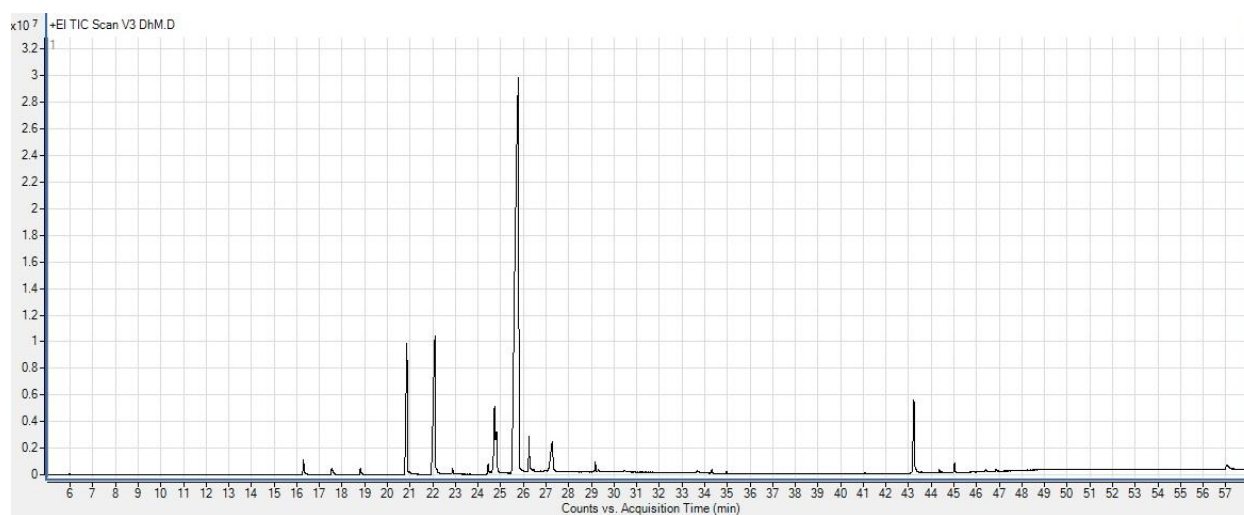


PRILOG

Prilog 36. GC-MS hromatogram etil-acetatnog ekstrakta *E. prunastri*



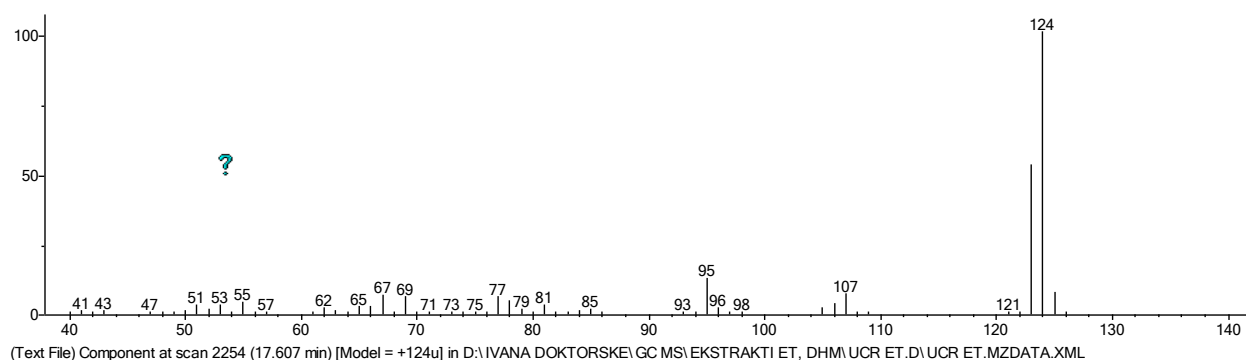
Prilog 37. GC-MS hromatogram dihlormetanskog ekstrakta *E. prunastri*



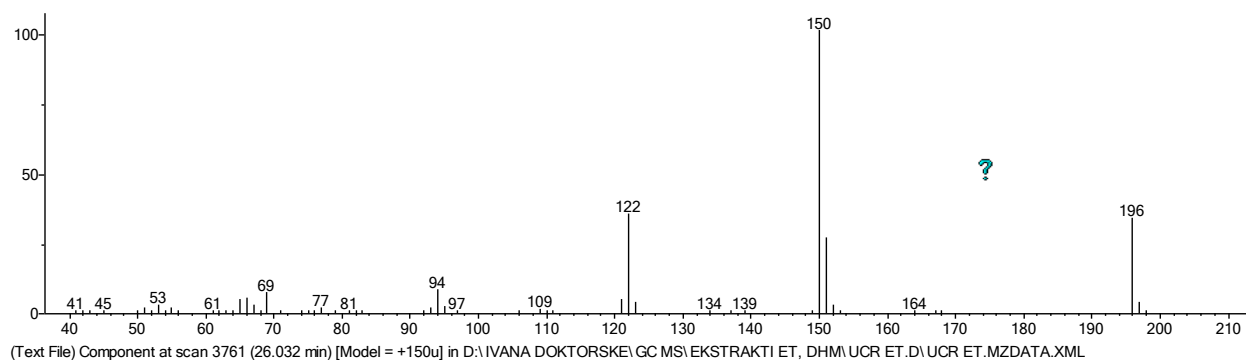
PRILOG

Maseni spektri

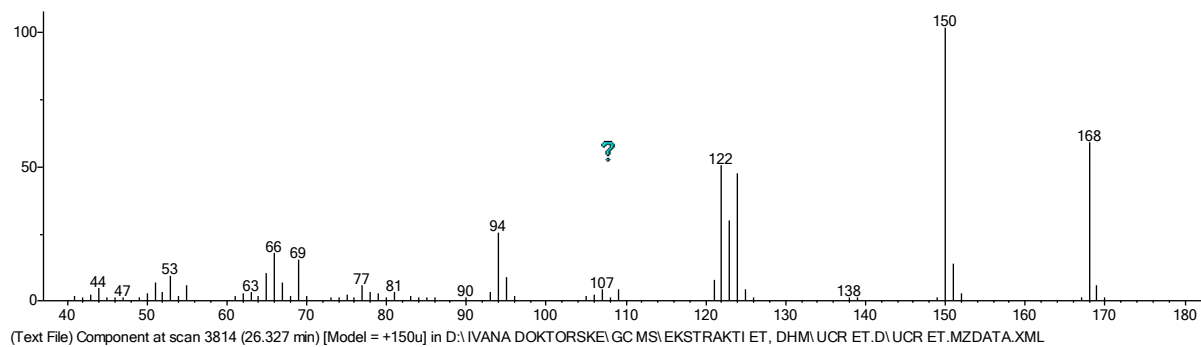
Prilog 38. (EI) MS spektar orcinola



Prilog 39. (EI) MS spektar etil-orselinata

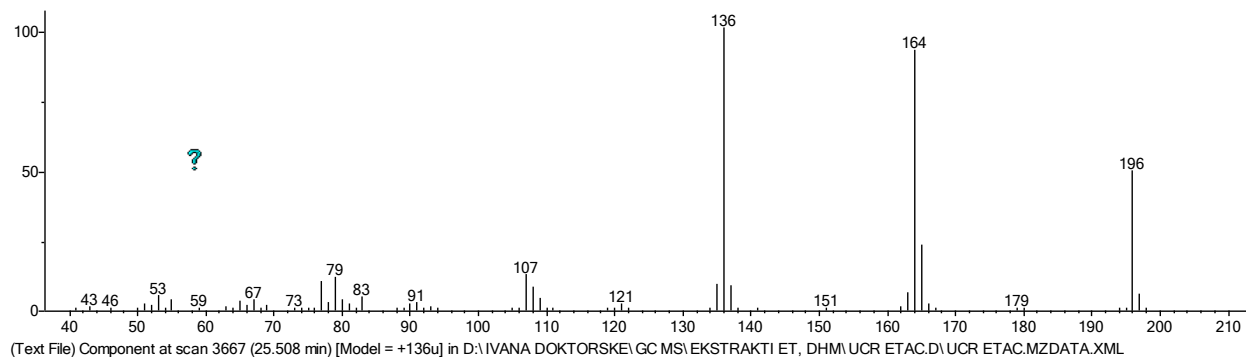


Prilog 40. (EI) MS spektar orselinske kiseline

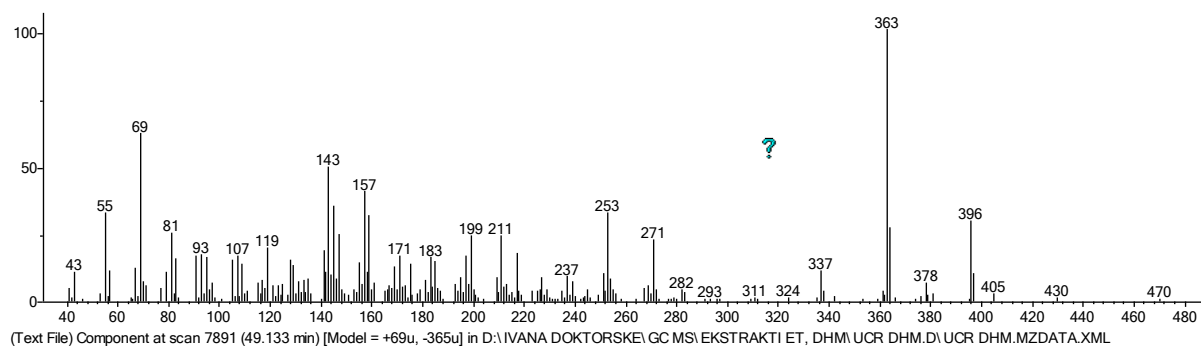


PRILOG

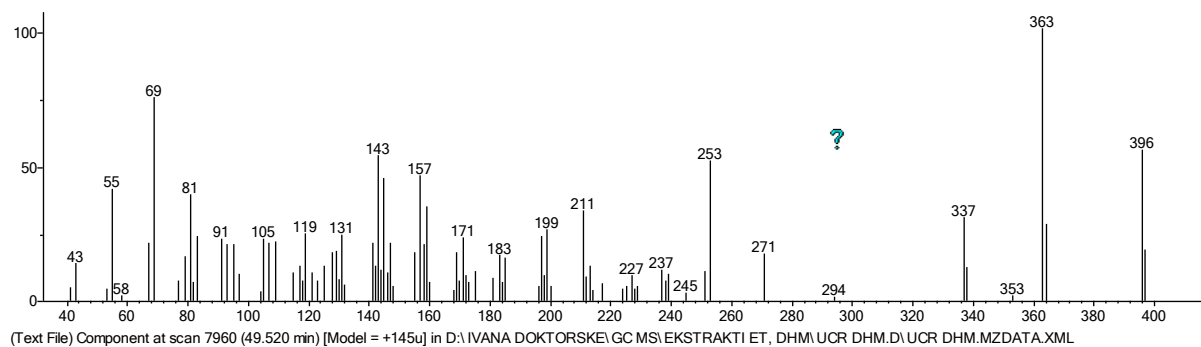
Prilog 41. (EI) MS spektar atrarične kiseline



Prilog 42. (EI) MS spektar sterola 1

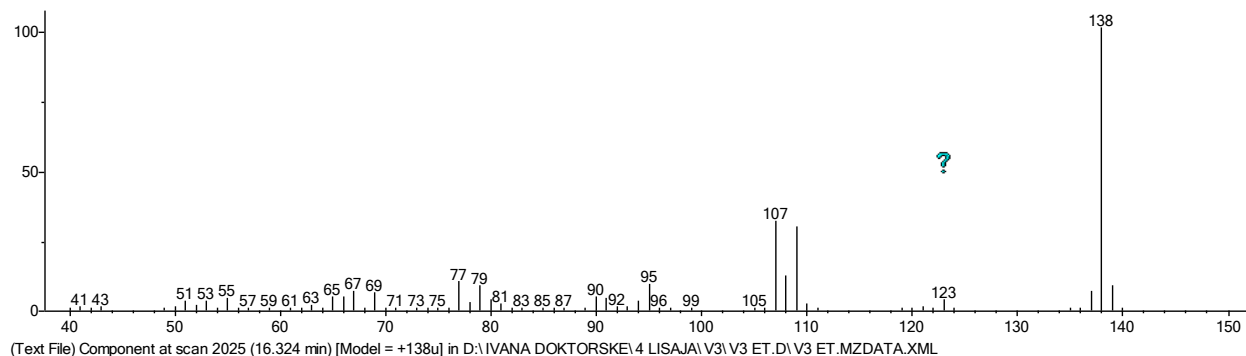


Prilog 43. (EI) MS spektar sterola 2

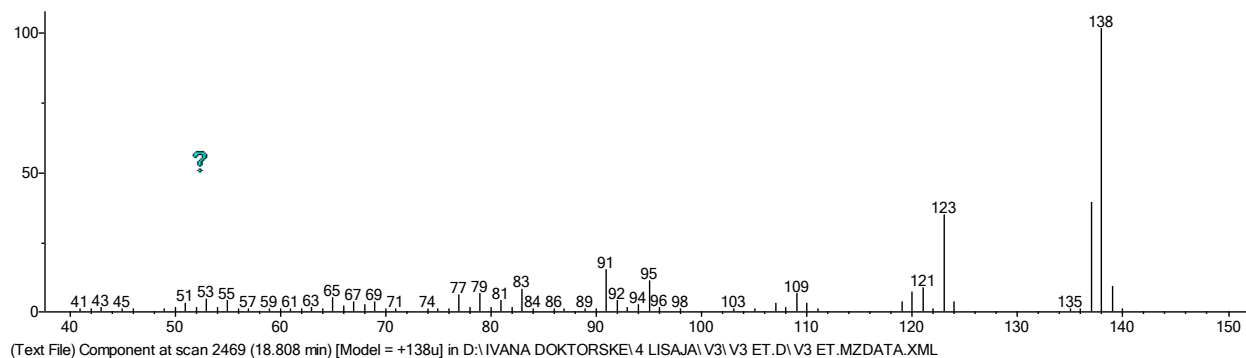


PRILOG

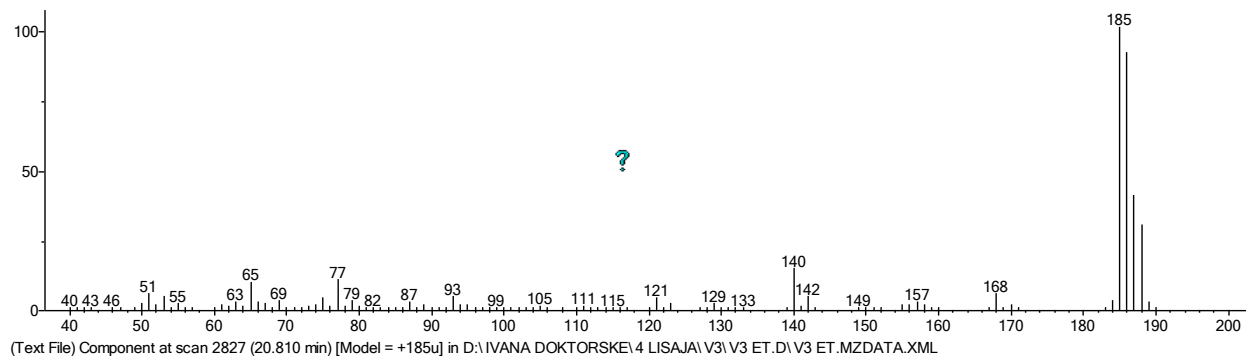
Prilog 44. (EI) MS spektar orcinol-monometil-etra



Prilog 45. (EI) MS spektar β -orcinola

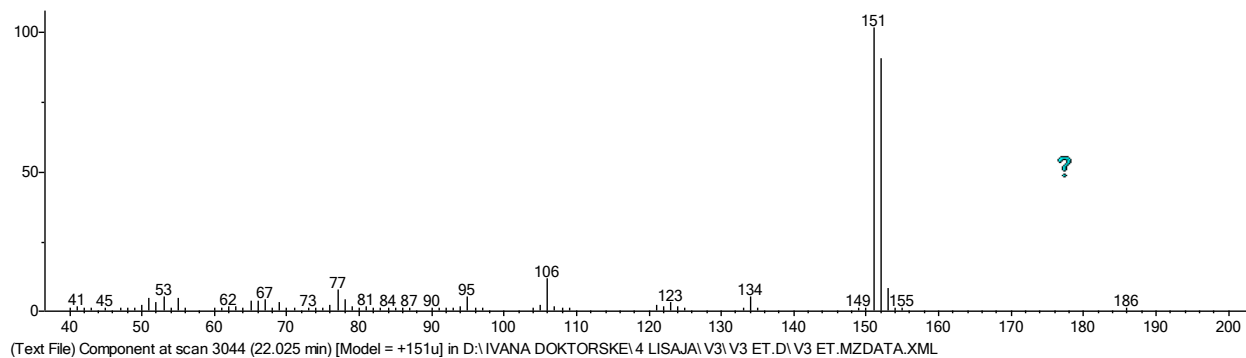


Prilog 46. (EI) MS spektar hloratranola

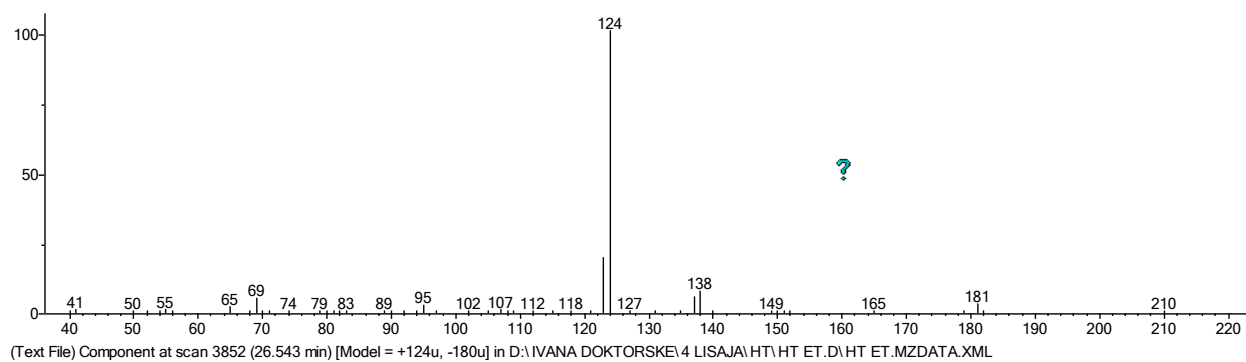


PRILOG

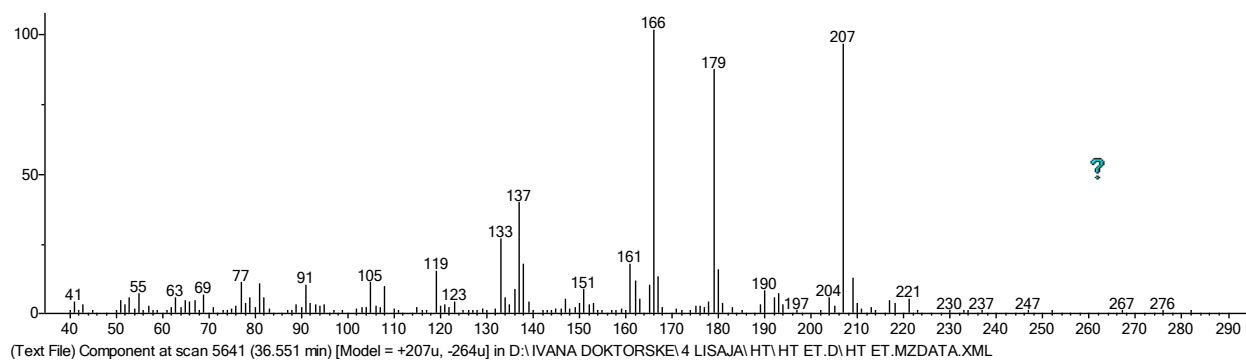
Prilog 47. (EI) MS spektar atranola



Prilog 48. (EI) MS spektar olivetola

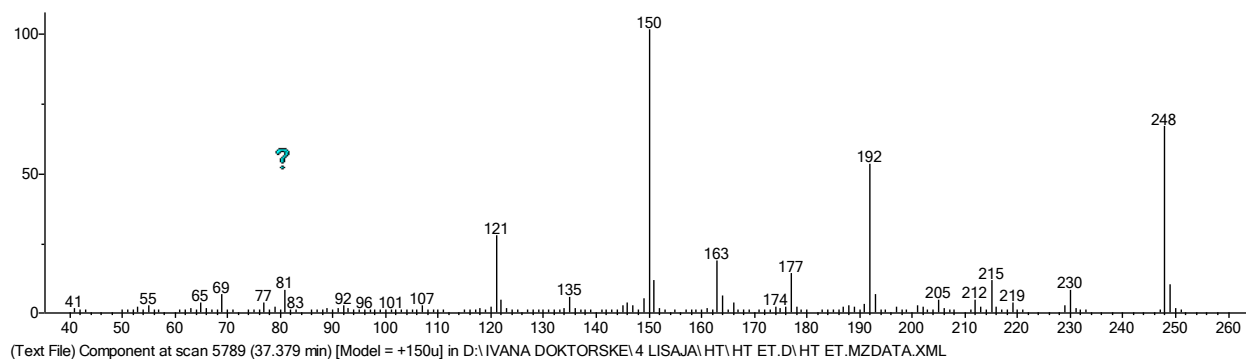


Prilog 49. (EI) MS spektar 3-hidroksi-olivetonida



PRILOG

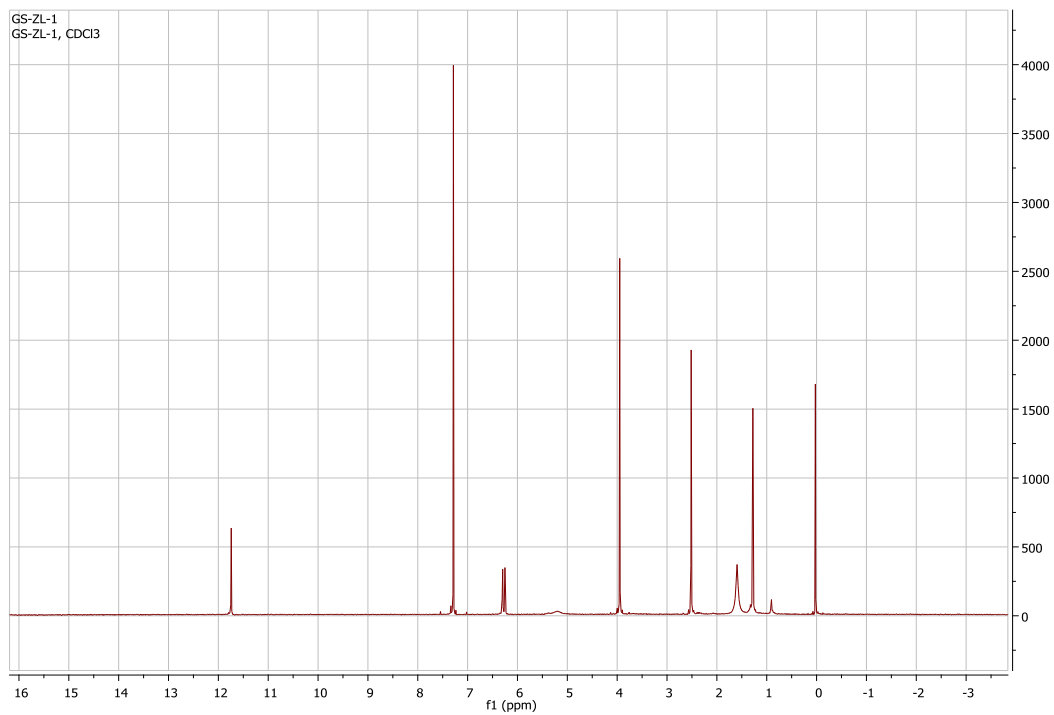
Prilog 50. (EI) MS spektar olivetonida



PRILOG

NMR spektri

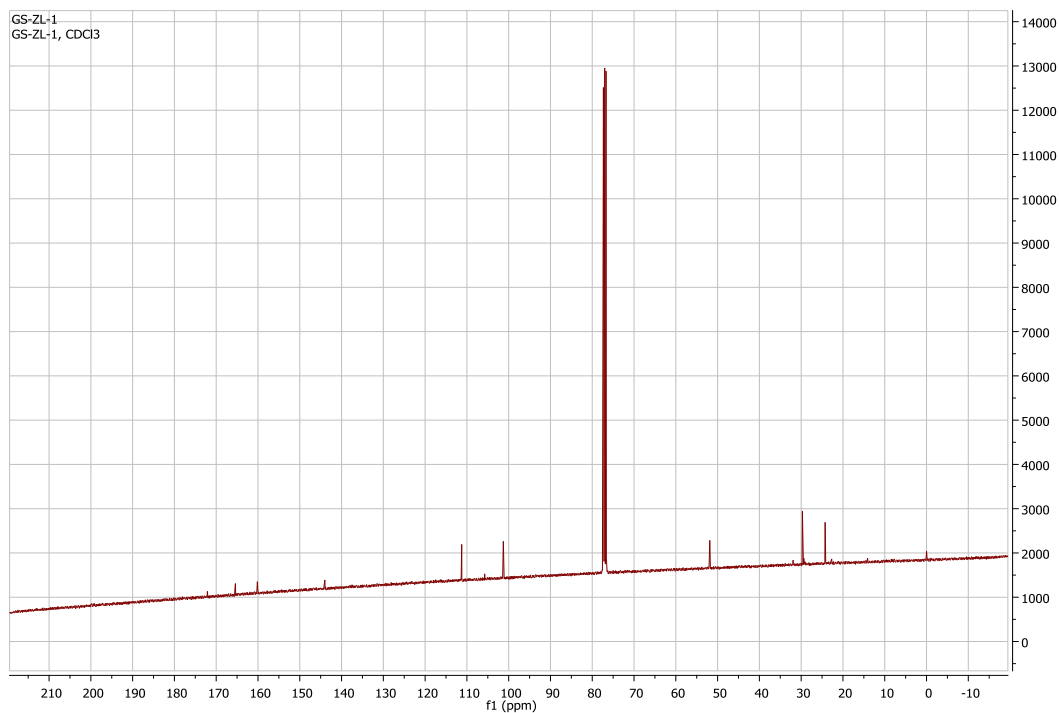
Prilog 51. ^1H NMR spektar metil-orselinata



Metil-orselinat ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 6,24 (1H, d, C5-CH), 6,28 (1H, D, C3-CH)
2,49 (3H, s, C8-CH₃), 3,92 (3H, s, -COOCH₃), 11,72 (1H, s, C4-OH)

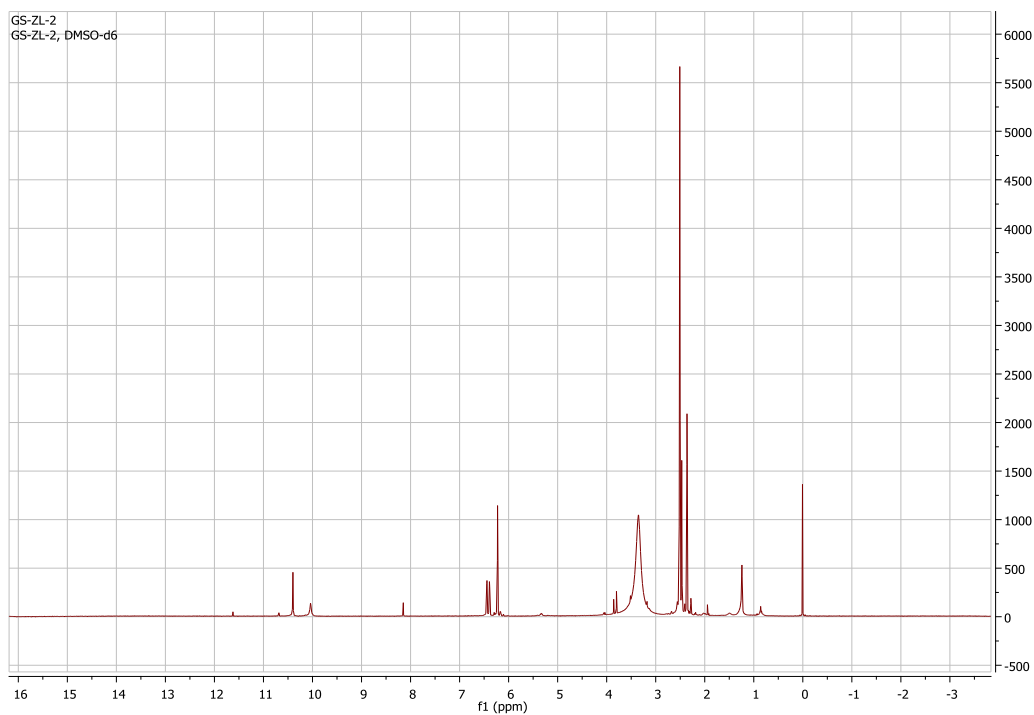
PRILOG

Prilog 52. ^{13}C NMR spektar metil-orselinata



Metil-orselinat ^{13}C NMR (CDCl₃): δ 105.76 (C1), 165.57 (C2), 101.28 (C3), 160.16(C4), 111.25 (C5), 144.00 (C6), 172.00 (C7), 24.24 (C8), 51.87 (-COOCH₃)

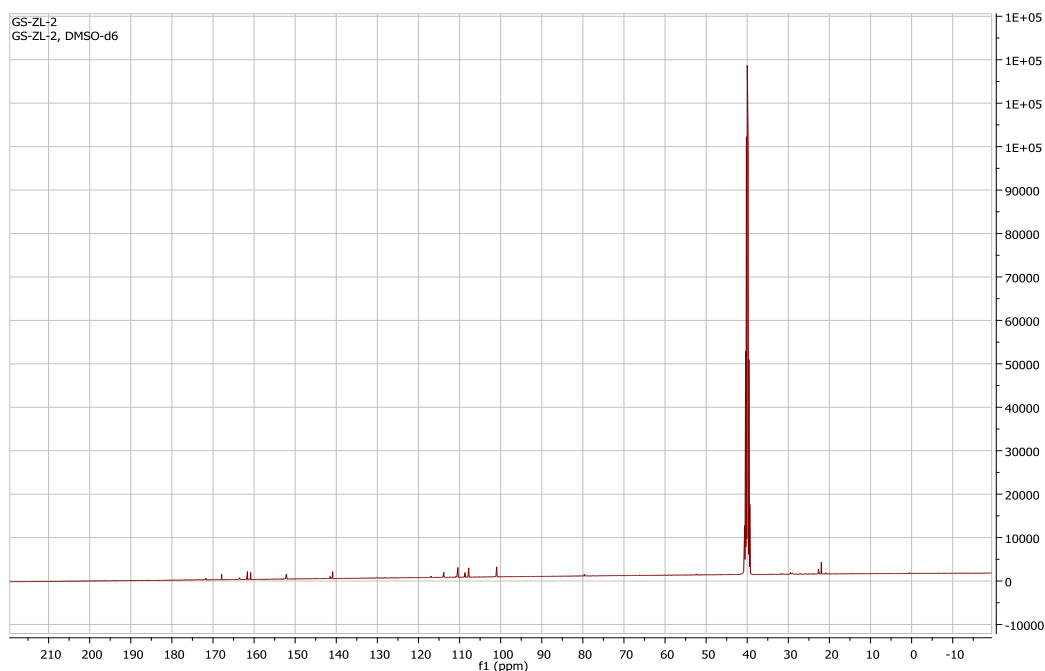
Prilog 53. ^1H NMR spektar lekanorne kiseline



PRILOG

Lekanorna kiselina ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 6,22 (1H, s, C3), 6,22 (1H, s, C3), 6,44 (1H, d, C3'), 6,39 (1H, d, c5'), 2,36 (3H, s, C8), 2,46 (3H, s, C8'), 10,39 (1H, s, C4-OH), 11,62 (1H, s, COOH)

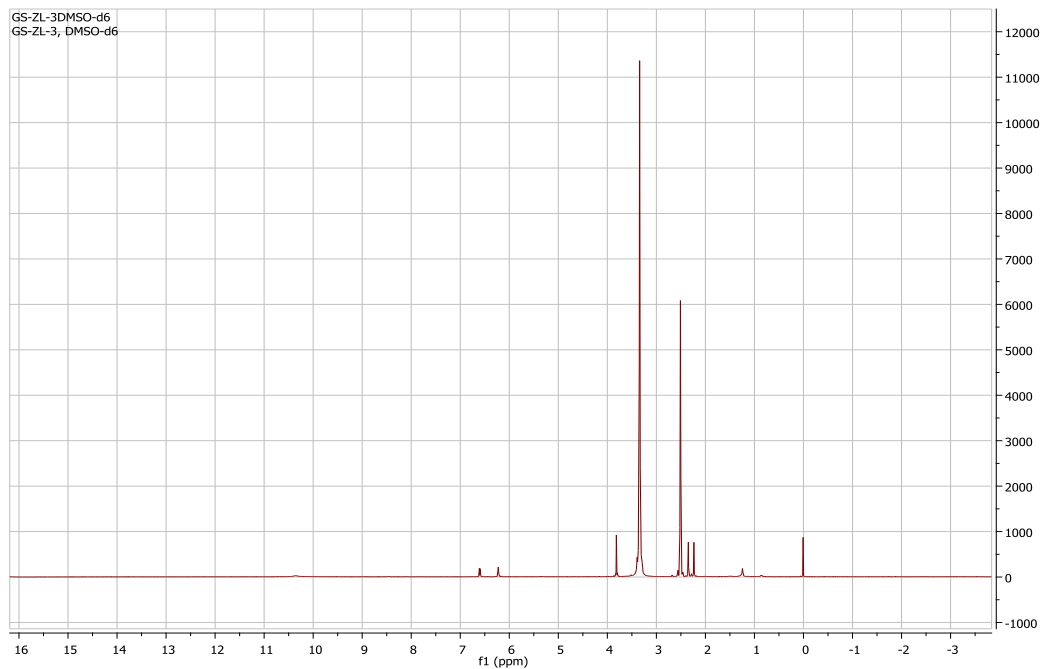
Prilog 54. ^{13}C NMR spektar lekanorne kiseline



Lekanorna kiselina ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 108,09 (C2), 160,26 (C2), 100,39 (C3), 161,03 (C4), 109,84 (C5), 140,29 (C6), 167,32 (C7), 21,40 (C8) 116,35 (C1'), 162,95 (C2'), 107,20 (C3'), 151,58 (C4'), 113,25 (C5'), 140,92 (C6'), 171,13 (C7'), 22,08 (C8')

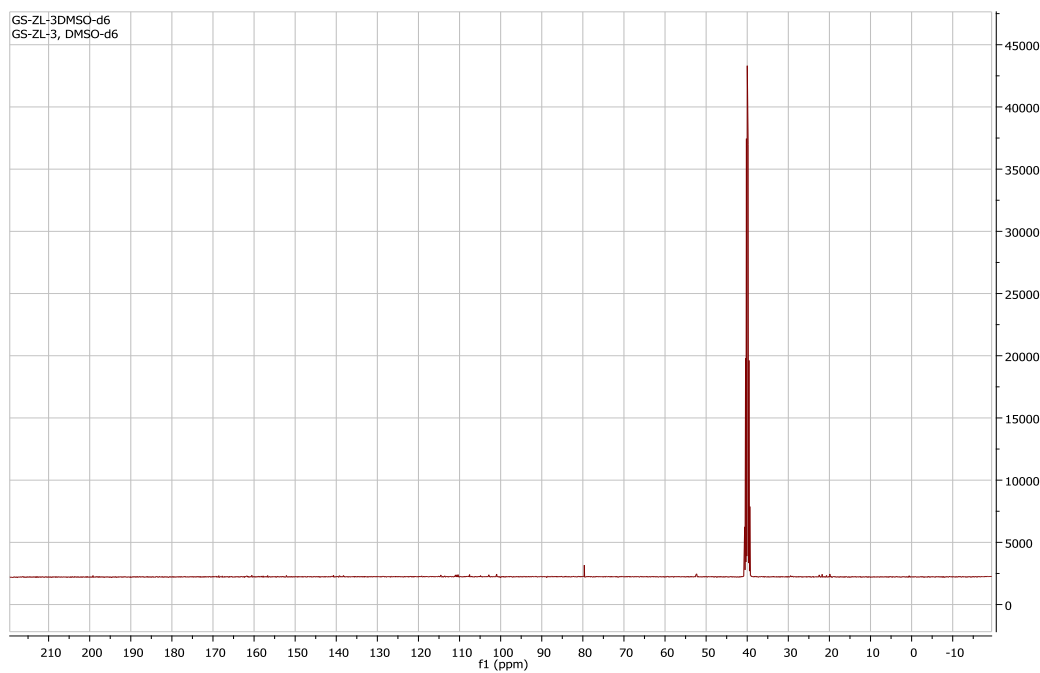
PRILOG

Prilog 55. ^1H NMR spektar metil-lekanorata kiseline



Metil-lekanorat ^1H NMR (d6-DMSO) δ (ppm): 6,22 (1H, d, C3), 6,21 (1H, d, C5), 6,60 (1H, d, C3'), 6,58 (1H, d, C5'), 2,34 (3H, s, C8), 2,23 (3H, s, C8'), 10,32 (1H, s, C2'-OH), 3,81 (3H, s, -COOCH₃)

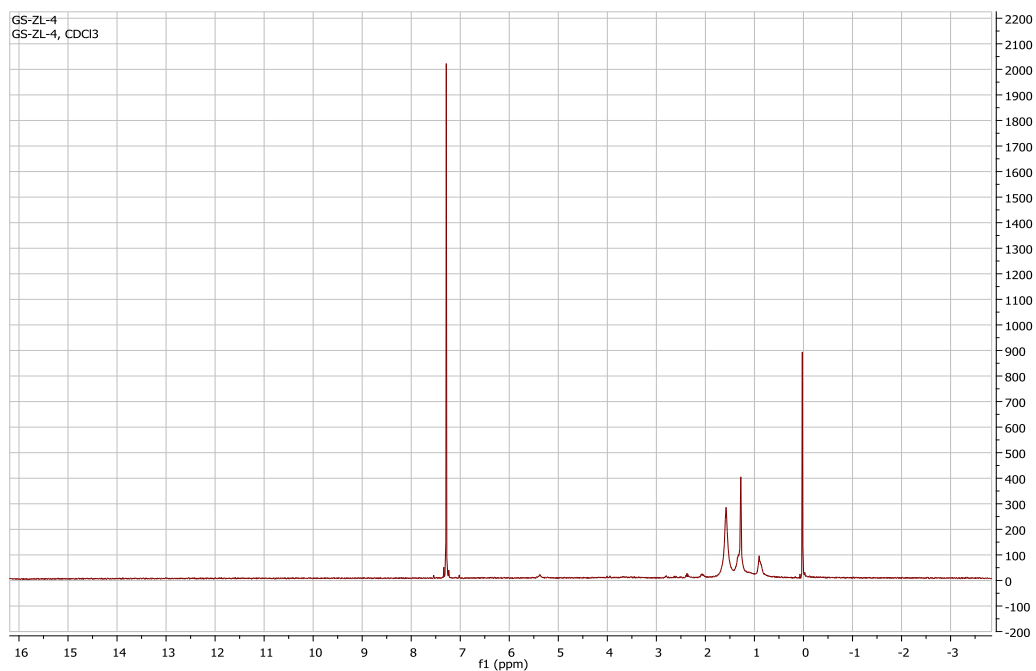
Prilog 56. ^{13}C NMR spektar metil-lekanorata



PRILOG

Metil-lekanorat ^{13}C NMR (d₆-DMSO) δ (ppm): 109,36 (C1), 157,80 (C2), 100,98 (C3), 160,54 (C4), 110,75 (C5) 139,20 (C6), 167,70 (C7), 21,80 (C8), 119,22 (C1'), 155,68 (C2'), 107,55 (C3'), 152,14 (C4'), 114,58 (C5'), 138,54 (C6'), 169,73 (C7'), 19,91 (C8'), 52,44 (COOCH₃)

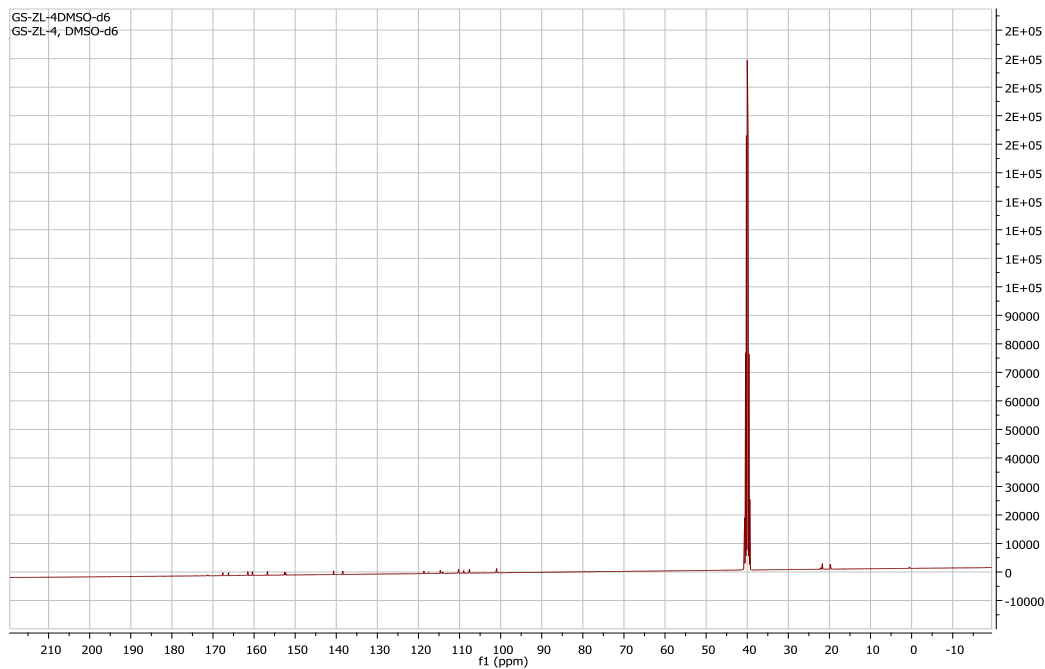
Prilog 57. ^1H NMR spektar giroforne kiseline



Giroforna kiselina ^1H NMR (d₆-DMSO) δ (ppm) giroforne kiseline: 6,22 (1H, bs, C3), 6,20 (1H, bs, C5), 6,54 (1H, bs, C3'), 6.,7 (1H, bs, C3'') 6,50 (1H, bs, C5'), 6,67 (1H, bs, C5''), 2,35 (3H, s, C8) , 2,36 (3H, s, C8'), 2,46 (3H, s, C8''), 10.01 (1H, s, C2-OH), 10,31 (1H, s, C2'-OH), 10,47 (1H, s, C2''OH)

PRILOG

Prilog 58. ^{13}C NMR spektar giroforne kiseline



Giroforna kiselina ^{13}C NMR (d6-DMSO) δ (ppm): 108,41 (C1) 159,82 (C2) 100,39 (C3), 160,95 (C4), 109,69 (C5), 140,07 (C6), 167,02 (C7), 21,15 (C8), 118,06 (C1'), 156,14 (C2'), 107,08*(C3'), 151,14 (C4') 114,11*(C5'), 137,82 (C6'), 165,62 (C7'), 19,21 (C8') 116,98 (C1''), 162,93 (C2''), 107,03 *(C3''), 151,74 (C4''), 113,51**(C5''), 140,25 (C6''), 170,65 (C7''), 21,47 (C8'')

8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

Biografija

Ivana G. Zlatanović rođena je u Nišu 01.07.1988. godine. Osnovnu školu je završila u Brestovcu sa odličnim uspehom a srednju medicinsku školu „dr Milenko Hadžić” u Nišu, smer medicinska sestra-tehničar, takodje je završila sa odličnim uspehom.

Upisala je osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu 2007. godine, na Departmanu za hemiju i završila ih 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,62 i stekla zvanje Hemičar.

Master studije primenjene hemije je završila u roku, sa prosečnom ocenom 9,84. Odbranila je master rad na katedri za Organsku hemiju i biohemiju 14.09.2012. godine pod nazivom „Izolovanje konstituenta acetonskog ekstrakta lišaja *Parmelia sulcata* Taylor” sa prosečnom ocenom 10 i time stekla zvanje Master hemičar. Za vreme trajanja master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Doktorske studije je upisala 2012. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu, na Departmanu za hemiju. U toku studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja a od maja 2017. godine angažovana je kao istraživač-saradnik na projektu „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena”, evidencioni broj 172047. U toku studija bila je anagažovana u svojstvu saradnika u nastavi na predmetima Hemija organskih polimera, Eksperimentalna organska hemija i Hemija sekundarnih metabolita na Departmanu za hemiju i Organska hemija na Departmanu za Biologiju i Ekologiju.

Učestvovala je na naučnim skupovima u zemlji, publikovala je rezultate istraživanja u časopisima od nacionalnog i međunarodnog značaja i to: 3 rada u istaknutom međunarodnom časopisu, 3 rada u međunarodnom časopisu, 2 rada u časopisu nacionalnog značaja i 7 saopštenja na naučnim skupovima. Radovi iz doktorata su označeni zvezdicom.

BIBLIOGRAFIJA

Bibliografija:

Radovi u istaknutom međunarodnom časopisu, M22:

- 1) Ivana Zrnzević, Miroslava Stanković, Vesna Stankov Jovanović, Violeta Mitić, Aleksandra Đorđević, **Ivana Zlatanović**, Gordana Stojanović, „*Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. acetone extract: HPLC analysis, genotoxicity, cholinesterase, antioxidant and antibacterial activity“ publikovan u časopisu *EXCLI Journal*, 2017, 16, 679-687 (DOI 10.17179/excli2017-301)
- 2) Ivana Zrnzević, Olga Jovanović, **Ivana Zlatanović**, Igor Stojanović, Goran Petrović, Gordana Stojanović „Constituents of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. extracts“ publikovan u časopisu *Natural Product Research*, 2017, 31 (7), 857-860 (DOI:10.1080/14786419.2016.1272112)
- 3) Gordana Stojanović, **Ivana Zlatanović**, Ivana Zrnzević, Miroslava Stanković, Vesna Stankov Jovanović, Bojan Zlatković „*Hypogymnia tubulosa* extracts: chemical profile and biological activities“ publikovan u časopisu *Natural product research*, 2017, (DOI: 10.1080/14786419.2017.1375926) *

Radovi u međunarodnom časopisu, M23:

- 1) **Ivana Zlatanović**, Miroslava Stanković, Vesna Stankov Jovanović, Violeta Mitić, Ivana Zrnzević, Aleksandra Đorđević, Gordana Stojanović „Biological activities of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey acetone extract“ publikovan u časopisu *Journal of Serbian Chemical Society*, 2017, 82 (2) 141-150. (doi.org/10.2298/JSC161019014Z)*
- 2) **Ivana Zlatanović**, Ivana Zrnzević, Olga Jovanović, Igor Stojanović, Goran Petrović, Gordana Stojanović „Chemical composition of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey and *Umbilicaria cylindrica* (L.) Duby extracts“, publikovan u časopisu *Natural product communication*, 2017, 12 (7) 1105-1105*
- 3) Gordana Stojanović, **Ivana Zlatanović**, Nataša Lazarević, Violeta Mitić, Aleksandra Đorđević, Miroslava Stanković, Bojan Zlatković „Contribution to the knowledge of the chemical composition, biological activities and radionuclides activity of the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach” publikovan u časopisu *Journal of Serbian Chemical Society*, 2018, 83 (0), 1-13 (DOI)*

Radovi u časopisu nacionalnog značaja, M51:

BIBLIOGRAFIJA

- 1) Ivana Zrnzević, **Ivana Zlatanović**, Jelena Lazarević, Olga Jovanović, Gordana Stojanović „GC-MS analysis of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl. extract“ publikovan u časopisu *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology*, 2015, 13 (2), 91-97 (DOI: 10.2298/FUPCT1502091Z)
- 2) **Ivana Zlatanović**, Goran Petrović, Olga Jovanović, Gordana Stojanović „Isolation and identification of secondary metabolites of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey” publikovan u časopisu *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology*, 2016, 14 (2), 125-133 (DOI: 10.2298/FUPCT1602125Z)*

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu, M34:

- 1) Ivana Zrnzević, Olga Jovanović, **Ivana Zlatanović**, Igor Stojanović, Goran Petrović, Gordana Stojanović "Constituents of *Ramalina capitata* (Ach.) Nyl extracts“ 6th *International Congress of Aromatic and Medicinal Plants CIPAM*, Coimbra (Portugalija), 29. Maj – 1. Jun 2016, broj strane 138.
- 2) **Ivana Zlatanović**, Olga Jovanović, Bojan Zlatković, Gordana Stojanović „HPLC profiles of *Umbilicaria crustulosa* and *U. cylindrica* extracts” *13th Symposium on the flora of southeastern Serbia and Neighboring Regions*, Stara planina Mt. 20-23 Jun, 2019, broj strane 191. *
- 3) Violeta Mitić, Vesna Stankov Jovanović, Jelena Nikolić, Marija Dimitrijević, **Ivana Zlatanović**, Gordana Stojanović „Heavy metals in *Morchella esculenta* mushrooms from Serbia” *13th Symposium on the flora of southeastern Serbia and Neighboring Regions*, Stara planina Mt. 20-23 Jun, 2019, broj strane 175.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu, M64:

- 1) **Ivana Zlatanović**, Ivana Zrnzević Olga Jovanović, Igor Stojanović, Goran Petrović, Gordana Stojanović „GC-MS profile of *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey and *Umbilicaria cylindrica* (L.) Duby extracts”, *12 th Symposium on the flora of southeastern Serbia and Neighboring Regions*, Kopaonik Mt. 16-19 Jun, 2015, broj strane 87. usmena prezentacija. *
- 2) Jovana Ickovski, Ivan Palić, Aleksandra Đorđević, Goran Petrović, Radomir Ljupković, **Ivana Zlatanović** „HPLC profile of methanolic extract of *Cynara scolymus* L.” *12 th Symposium on the flora of southeastern Serbia and Neighboring Regions*, Kopaonik Mt. 16-19 Jun 2016, broj strane 106.
- 3) Ivana Zrnzević, **Ivana Zlatanović**, Vladimir Dimitrijević, Gordana Stojanović, „Biološka aktivnost sekundarnih metabolita lišaja”, Prvi naučni skup a

BIBLIOGRAFIJA

medjunarodnim učešćem „ Nastava i nauka u vremenu i prostoru ”, Leposavić 6-7 mart 2015, broj strane 95.

- 4) Ivana Zlatanović, Goran Petrović, „Chemical composition of *Parmelia sulcata* Taylor acetone extract” 2nd Conference of the Young Chemists of Serbia, Niš 5-7. Jun 2014, broj strane 137.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**Хемијски састав, антибактеријска, антиоксидативна и генотоксична активност
лишајева *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise,
Hypogymnia tubulosa (Schaer.) Nav. и *Evernia prunastri* (L.) Ach**

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 02.07.2019.

Потпис аутора дисертације:

Убана, Т. Враничић
(Име, средње слово и презиме)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Хемијски састав, антибактеријска, антиоксидативна и генотоксична активност
лишајева *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise,
Hypogymnia tubulosa (Schaer.) Nav. и *Evernia prunastri* (L.) Ach**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан
штампаном облику.

У Нишу, 02.04.2019.

Потпис аутора дисертације:

Ивсана Т. Златановић
(Име, средње слово и презиме)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**Хемијски састав, антибактеријска, антиоксидативна и генотоксична активност
лишајева *Umbilicaria crustulosa* (Ach.) Frey, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise,
Hypogymnia tubulosa (Schaer.) Nav. и *Evernia prunastri* (L.) Ach**

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 02.07.2019.

Потпис аутора дисертације:

Ивана Т. Златисањковић
(Име, средње слово и презиме)